

PATENT COOPERATION TREATY

EO/US
PCT/JP99/06804

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: <p style="text-align: center;">24 August 2000 (24.08.00)</p>	
International application No.: <p style="text-align: center;">PCT/JP99/06804</p>	Applicant's or agent's file reference: <p style="text-align: center;">JA901392</p>
International filing date: <p style="text-align: center;">03 December 1999 (03.12.99)</p>	Priority date: <p style="text-align: center;">19 February 1999 (19.02.99)</p>
Applicant: <p style="text-align: center;">SAKANAKA, Masahiro et al</p>	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

14 April 2000 (14.04.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p style="text-align: center;">The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	Authorized officer: <p style="text-align: center;">J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

特許協力条約に基づく国際出願
国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。



国際予備審査機関記入欄

国際予備審査機関の承認		請求書の受理の日	
第 I 欄 国際出願の表示		出願人又は代理人の書類記号 JA901392	
国際出願番号 PCT/JP99/06804	国際出願日 (日. 月. 年) 03.12.99	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 19.02.99	
発明の名称 ジンセノサイド Rb ₁ からなる脳血管再生・再構築促進剤 ならびに神経組織二次変性抑止剤			
第 II 欄 出願人			
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 科学技術振興事業団 Japan Science and Technology Corporation 〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町4丁目1番8号 1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-ken 332-0012 JAPAN		電話番号: 048-226-5619 ファクシミリ番号: 048-226-5652 加入電話番号:	
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 阪中 雅広 SAKANAKA Masahiro 〒791-0204 日本国愛媛県温泉郡重信町大字志津川 1191番地13 1191-13, Oaza Shitsukawa, Shigenobu-cho, Onsen-gun, Ehime-ken 791-0204 JAPAN			
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 田中 潤也 TANAKA Junya 〒791-0203 日本国愛媛県温泉郡重信町大字横河原1375 愛大横河原宿舍115号 Suite 115, Ehime University Yokogawara-staff house, 1375, Oaza Yokogawara Shigenobu-cho, Onsen-gun, Ehime-ken 791-0203 JAPAN			
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
<input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人が続葉に記載されている。			



第Ⅱ欄の続き 出願人

この第Ⅱ欄の続きを使用しないときは、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

佐藤 康二 SATO Kohji

〒433-8118 日本国静岡県浜松市相生町4番13-505号

4-13-505, Aioi-cho, Hamamatsu-shi, Shizuoka-ken

433-8118 JAPAN

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

国籍（国名）：

住所（国名）：

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

国籍（国名）：

住所（国名）：

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

国籍（国名）：

住所（国名）：

☐ その他の出願人が他の親葉に記載されている。



第Ⅲ欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

- ☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。
- ☐ 今回新たに選任された者である。 先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。
- ☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

10266 弁理士 佐伯 憲生 SAEKI Norio

電話番号：

03-5205-2521

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi 3-chome,

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

ファクシミリ番号：

03-5205-2522

加入電話番号：

☐ 通知のためのあて名： 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第Ⅳ欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：＊

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

- ☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。
- ☐ 明細書に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。
- ☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。
- ☐ 請求の範囲に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。
- ☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正（添付した説明書も含む）を基礎とすること。
- ☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。
- ☐ 図面に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。
- ☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲に関する補正を差し替えることによって考慮されることを望む。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過後まで延期されることを望む（ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く（規則69.1(d)））。

（この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。）

* 記入がない場合は、1) 補正がないか又は国際予備審査機関が補正（原本又は写し）を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2) 国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正（原本又は写し）を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は、日本語 であり、

- ☒ 国際出願の提出時の言語である。
- ☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。
- ☐ 国際出願の公開の言語である。
- ☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第Ⅴ欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国（即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第Ⅱ章に拘束されている国）を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。：



第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

国際予備審査機関記入欄

受 領 未 受 領

1. 国際出願の翻訳文・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 枚

☐☐

2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書・・・・・・・・・・ 枚

☐☐3. 特許協力条約第19条の規定に基づき補正書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し・・・・・・・・・・ 枚☐☐4. 特許協力条約第19条の規定に基づき説明書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し・・・・・・・・・・ 枚☐☐

5. 書簡・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 枚

☐☐

6. その他 (書類名を具体的に記載する) : 枚

☐☐

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙3. ☐ 包括委任状の写し☒ 納付した手数料に相当する特許印紙を
貼付した書面4. ☐ 記名押印 (署名) に関する説明書☒ 国際事務局の口座への振込を証明する書面5. ☐ スクリーンショット又はアミノ酸配列表
(フレキシブルディスク)2. ☐ 別個の記名押印された委任状6. ☐ その他 (書類名を具体的に記載する) :

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

佐 伯 憲 生



国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則 80.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。☐ 出願人に通知した。4. ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:



P C T

手 数 料 計 算 用 紙

国 際 予 備 審 査 請 求 書 の 附 属 書

国際予備審査機関記入欄

国際出願番号

P C T / J P 9 9 / 0 6 8 0 4

出願人又は代理人の登録記号

J A 9 0 1 3 9 2

国際予備審査機関の日付印

出願人

科学技術振興事業団

所定の手数料の計算

1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）
第18条第1項第4号の規定による手数料
（予備審査請求料）（注1）

2 8 , 0 0 0 円 P

2. 取扱手数料（注2）.....

1 6 , 5 0 0 円 H

3. 所定の手数料の合計

P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入...

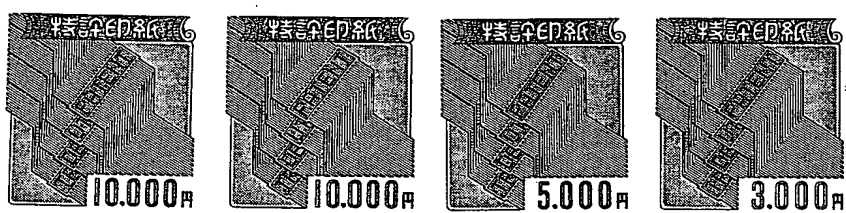
4 4 , 5 0 0 円

合 計

（注1） 法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2） 取扱手数料については、国際予備審査機関である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振り込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。





予備審査請求手数料

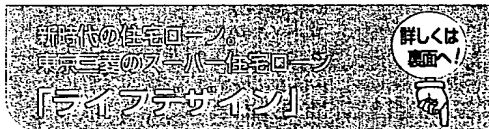
28,000円



ご利用明細

本日はご来店いただきありがとうございます。

年月日	時刻	取扱店番	銀行番号支店番号	口座番号	印紙税申告納付につき廻町
120413	10.22	022	0022	0632671	
お取引内容	お取引金額	お取扱いで きない場合	残高	お取扱金額	
お振込	¥16,500*				
ご案内				500円 100円 50円 10円 5円 1円	
お受取人 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA 様					
ご依頼人 タクミツキヨシムシヨ リエキ ノリオ 様 0352052521					
税込手数料 105円をご利用口座からいただきました					



- 残高の金額は決済未確定の証券類を含んでいます。
- 残高の頭部に「-」がある場合は、お借入れ残高を表わします。



東京三菱銀行

取扱手数料

16,500円

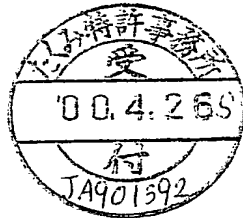


許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

佐伯 憲生



殿

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所

PCT/JP99/06804

PE402

P C T

国際予備審査請求書の受理通知書

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、実施細則601(a)〕

発送日（日．月．年）

25.04.00

出願人又は代理人
の書類記号

JA901392

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/06804

国際出願日（日．月．年）

03.12.99

優先日（日．月．年）

19.02.99

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

14 日 04 月 00 年

2. この受理の日は次に示す日である。

- ☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則61.1(b)）
- ☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則59.3(e)）
- ☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）
詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/IPEA/402（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）



出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋三丁目15番2号
高愛ビル9階

PCT見解書

(法第13条)
[PCT規則66]

発送日
(日.月.年)

18.07.00

出願人又は代理人
の書類記号

JA901392

応答期間

上記発送日から 2 月 以内

国際出願番号

PCT/J P 99/06804

国際出願日

(日.月.年) 03.12.99

優先日

(日.月.年) 19.02.99

国際特許分類 (IPC)

Int. Cl⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105, G01N33/15, G0133/15, G01N33/50 // C07J17/00

出願人 (氏名又は名称)

科学技術振興事業団

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

IV ☒ 発明の単一性の欠如

V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に応答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。

どのように?

法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 19.06.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

4 P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492



I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))



IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求め（様式PCT/IPEA/405）に対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

- 1) 請求の範囲1-12はジニセリット[®]Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲15-16はジニセリット[®]Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の外傷の悪化のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲27は上記医薬組成物を製造するためのジニセリット[®]Rb₁の使用に係る発明である。
- 2) 請求の範囲13はジニセリット[®]Rb₁を含有してなる血管の再生又は再構築を促進するための医薬組成物に係る発明である。
- 3) 請求の範囲14はジニセリット[®]Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の二次変性のための医薬組成物に係る発明である。
- 4) 請求の範囲17-18はジニセリット[®]Rb₁を含有してなるオリゴデント[®]細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物に係る発明である。
- 5) 請求の範囲19-20はジニセリット[®]Rb₁を含有してなる脱髄のための医薬組成物に係る発明である。
- 6) 請求の範囲21-23はジニセリット[®]Rb₁をリード化合物として神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療のための有効成分を探索する方法に係る発明であり、請求の範囲24は上記方法により得られた治療剤に係る発明であり、請求の範囲25は神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療剤の有効成分を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®]Rb₁の使用に係る発明である。
- 7) 請求の範囲26は脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®]Rb₁の使用に係る発明である。

上記1)～7)は、ジニセリット[®]Rb₁又はこれをリード化合物として得られる化合物を医薬に適用する技術に関するものであるが、適用疾患はそれぞれ異なるものであり、また、これらが密接な薬理作用に基づくものであるとも言い難い。

したがって、1)～7)に記載した発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められないので、この国際出願は単一性を満たしていると認めることはできない。

3. したがって、この見解書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

☒ すべての部分

☐ 請求の範囲 _____ に関する部分



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条（PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1 - 27	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1 - 20, 22, 23, 27	有
	請求の範囲	21, 24 - 26	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 27	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

国際調査報告で引用された文献は下記

1. JP, 4-504414, A
2. Neuroscience Research, Vol. 28(1997)p. 191-200
3. Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 30, No. 9(1995)p. 674-678
4. Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 17, No. 1(1996)p. 44-48

である。

1) 請求の範囲21, 24, 25について

文献1には、ジンセノサイドRb₁がアルツハイマー型老人性痴呆症及び老人性痴呆症の治療に有効であることが記載されており、上記の両痴呆症は神経組織に対する疾患である。

本願出願前、薬物の技術開発分野において、ある特定の薬理活性を有する化合物をリード化合物として用い、該化合物の構造を改変し、種々のスクリーニングを行い、最適又は好適な化合物を選択することは周知技術あることから、ジンセノサイドRb₁をリード化合物として用い、アルツハイマー型老人性痴呆症及び老人性痴呆症の治療に有効な化合物を探索し、該化合物を医薬に適用することは、文献1の記載から当業者が容易に成し得たことである。

そして、請求の範囲21, 24及び25に記載された発明において奏せられる効果についても、文献1の記載及び上記周知技術から当業者が予測できないほどの格別顕著な効果が奏せられているとも認められない。

したがって、請求の範囲21, 24及び25に記載された発明は、文献1の記載から進歩性を有しない。

2) 請求の範囲26について

文献2及び3には、ジンセノサイドRb₁が神経細胞保護作用を有していることが記載されている。

文献4には、ジンセノサイドRb₁が脳保護作用を有していることが記載されている。

本願出願前、薬物の技術開発分野において、ある特定の薬理活性を有する化合物



補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

をリード化合物として用い、該化合物の構造を改変し、種々のスクリーニングを行い、最適又は好適な化合物を選択することは周知技術あることから、ジンセノサイド R b₁ をリード化合物として用い、神経細胞保護作用又は脳保護作用を有する化合物を探索し、該化合物を医薬に適用することは、文献 2～4 の記載から当業者が容易に成し得たことである。

そして、請求の範囲 26 に記載された発明において奏せられる効果についても、文献 2～4 の記載及び上記周知技術から当業者が予測できないほどの格別顕著な効果が奏せられているとも認められない。

したがって、請求の範囲 26 に記載された発明は、文献 2～4 の記載から進歩性を有しない。

3) 請求の範囲 1-20, 22, 23 及び 27 について

請求の範囲 1-20, 22, 23 及び 27 に記載された発明は、国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、当業者にとって自明なものでもない。



手 続 正 査

特許庁長官 (特許庁審査官) 殿

1 国費出願の表示

2 出願人 (代表者)
氏名 (名称)
あて名
国籍
住所

3 代理人
氏名
あて名

4 補正命令の日付

5 補正の対象

6 補正の内容

7 総付書類の日録



11-11-11

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

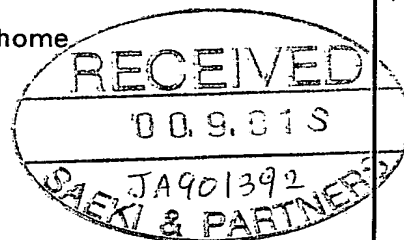
INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
Taka-ai Building
9th floor
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103-0027
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)		
Applicant's or agent's file reference JA901392		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP99/06804	International filing date (day/month/year) 03 December 1999 (03.12.99)	Priority date (day/month/year) 19 February 1999 (19.02.99)
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : CH, DE, FR, GB, IT

National : CN, KR, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

None

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



特許協力条約



発信人 日本国特許庁（受理官庁）

P C T

出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所

国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP99/06804

RO105

発送日（日．月．年）

14.12.99

出願人又は代理人
の書類記号

JA901392

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/06804

国際出願日（日．月．年）

03.12.99

優先日（日．月．年）

19.02.99

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、14日12月99年 に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

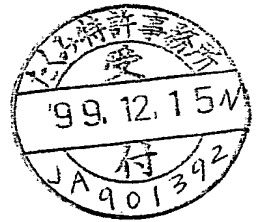
様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



許協力条約



P C T

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所

調査用写しの受理通知書

（法施行規則第39条）

〔PCT規則25.1〕

PCT/JP99/06804

SA202

発送日（日．月．年）

14.12.99

出願人又は代理人
の書類記号

JA901392

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/06804

国際出願日（日．月．年）

03.12.99

優先日（日．月．年）

19.02.99

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日に受理したので通知する。

国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日に受理したので通知する。

14 日 12 月 99 年（受理の日）

2. ☐ 調査用写しには、コンピューター読取りが可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が添付されている。

3. 国際調査報告の作成期間

国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。

4. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

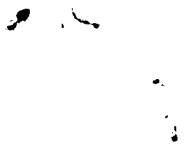
郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/ISA/202（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

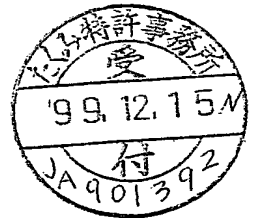
〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛
ビル9階 たくみ特許事務所

PCT/JP99/06804

RO106

P C T



手続補正命令書

（法第6条、法施第30条）
〔PCT3条（4）、（i）14条（1）、規則26〕

		発送日（日、月、年）	14.12.99
出願人又は代理人 の書類記号	JA901392	応答期間	発送日から 1箇月以内
国際出願番号	PCT/JP99/06804	国際出願日（日、月、年）	03.12.99
出願人（氏名又は名称） 科学技術振興事業団			

出願人は、上記期間内に手続きの補正をしなければならない。補正すべき事項は、次の附属書に記載されている。

☐ 附属書A

☐ 附属書B

☒ 附属書C

（注意）

補正の方法

手続補正書に補正事項を補正した差替え用紙を添付することにより行う。また、手続補正書の「補正内容」の欄に差替えられる用紙と差替え用紙との相違について記載する。なお、補正によって書き換えられる用紙の明瞭さ及び直接複製の可能性に悪影響を及ぼすことなく手続補正書の「補正内容」の欄から記録原本への書き換えが容易にできる場合には差替え用紙を省略することができる。

（PCT規則26.4（a）、法施行規則様式第15備考4参照）

注意

補正がされないときは、国際出願は取り下げられたものとみなす旨の決定がされる。

（法第7条第1項、PCT規則26.5参照）

この手続補正命令書の写し及び附属書の写しは、国際事務局

☐ 及び国際調査機関

に、送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/106（1998年7月）

権限のある職員

特許庁長官



図面は、特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律施行規則第30条第1項第3号に規定する要件に適合しない。

国際出願の図面について次の不備を発見した。

I. 図面の用紙に関して

- a. ☐ 用紙が直接複製することができない。
- b. ☐ 用紙に折り目、しわ、裂け目がある。
- c. ☐ 用紙の両面が用いられている。
- d. ☐ 用紙が可撓性のある／丈夫な／白色の／滑らかな／光沢のない／耐久性のあるものではない。
- e. ☐ 図面が別の用紙で作成されていない。
- f. ☐ 用紙が所定のとり方ではない。
- g. ☐ 用紙の大きさが日本工業規格A列4番の大きさではない。(横21cm、縦29.7cm)
- h. ☐ 用紙の余白が所定のとり方ではない。(最少：上端2.5cm、左端2.5cm、右端1.5cm、下端1cm)
- i. ☐ 用紙に記載されている出願人又は代理人の書類記号が用紙の上端の余白の左隅であって上端から1.5cm以内に記載されていない。
- j. ☐ 出願人又は代理人の書類記号が12字を超えている。
- k. ☐ 用紙の使用することができる面又は使用した面の周囲に枠が記載されている。
- l. ☐ 用紙にアラビア数字により連続した番号が付されていない。(例：1/3、2/3、3/3)
- m. ☐ 用紙の番号が用紙の上端又は下端の中央に付されていない。
- n. ☐ 用紙の番号が余白内に記載されている。(余白には記載できない。h参照)
- o. ☐ 用紙に訂正／重ね書き／行間挿入／削除箇所が多く行われている。
- p. ☐ 用紙に複写の際のよごれがある。

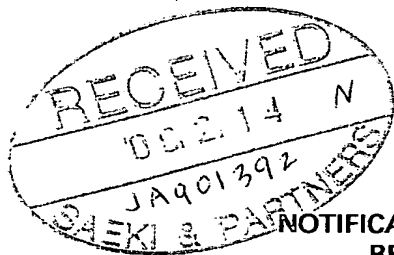
II. 図面に関して

- a. ☒ 図面が直接複製することができない。(図8は写真であったが、写真を3部提出した) (図1, 2, 4, 5)
- b. ☒ 不必要な記載事項がある。(図1, 2, 4, 5)
- c. ☐ 図面の語句が翻訳された場合に、図面の線にかかるような記載がある。
- d. ☐ 耐久性のある、黒色の、十分に濃厚な濃墨等を用い、太さの均一な、かつ、明瞭な線で着色することなく作成されていない。
- e. ☐ 平行斜線によらない切断面がある。
- f. ☐ 縮尺による写真複製をしたときに容易に識別できない記載がある。
- g. ☐ 図式によらない尺度が記載されている。
- h. ☐ 簡潔かつ明瞭でない数字、文字、引出線がある。
- i. ☐ 製図用具を用いることなしに引かれた線がある。
- j. ☐ 図中の他の要素に対し妥当でない比率で記載した図がある。
- k. ☐ 0.32cm以下の大きさの数字又は文字がある。
- l. ☐ ローマ字及び慣習となっているギリシャ文字以外の文字の記載がある。
- m. ☐ 2以上の用紙に描かれた図であって単一の完全な図を得るように用紙を合わせたときに隠れる部分がある。
- n. ☐ 適切に配置されていない図がある。
- o. ☐ 個々の図に連続したアラビア数字による番号が付されていない。
- p. ☐ 用紙の番号と関係のある番号が付されている図がある。
- q. ☐ 明細書に用いていない引用符号が記載されている。
- r. ☐ 明細書に用いられている引用符号の記載がない。
- s. ☐ 異なった引用符号により表示された同一の部分がある。

(注意)



PATENT COOPERATION TREATY



PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
Taka-ai Building
9th floor
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103-0027
JAPON

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

Date of mailing (day/month/year) 03 January 2000 (03.01.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference JA901392	International application No. PCT/JP99/06804

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION (for all designated States except US)
SAKANAKA, Masahiro et al (for US)

International filing date : 03 December 1999 (03.12.99)
Priority date(s) claimed : 19 February 1999 (19.02.99)
30 November 1999 (30.11.99)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 17 December 1999 (17.12.99)

List of designated Offices :

EP : CH, DE, FR, GB, IT
National : CN, KR, US

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: Y. KUWAHARA Telephone No. (41-22) 338.83.38
---	--



INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

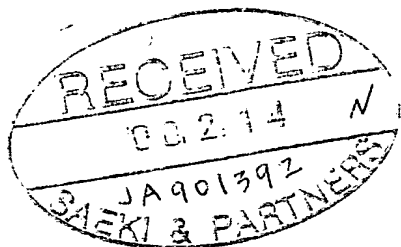
Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.





PARENT COOPERATION TREA

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SAEKI, Norio
Taka-ai Building
9th floor
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103-0027
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 04 February 2000 (04.02.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference JA901392	
International application No. PCT/JP99/06804	International filing date (day/month/year) 03 December 1999 (03.12.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 19 February 1999 (19.02.99)
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
19 Febr 1999 (19.02.99)	11/41517	JP	28 Janu 2000 (28.01.00)
30 Nove 1999 (30.11.99)	11/340850	JP	28 Janu 2000 (28.01.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Taïeb Akremi ↗


Telephone No. (41-22) 338.83.38



特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	
国際出願日	
(受付印)	
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)	

JA901392

第 I 欄 発明の名称

ジンセノサイド Rb₁ からなる脳血管再生・再構築促進剤
ならびに神経組織二次変性抑止剤

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

科学技術振興事業団

Japan Science and Technology Corporation

〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町4丁目1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-ken

332-0012 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

048-226-5619

ファクシミリ番号:

048-226-5652

加入電信番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

阪中 雅広 SAKANAKA Masahiro

〒791-0204 日本国愛媛県温泉郡重信町大字志津川

1191番地13

1191-13, Oaza Shitsukawa, Shigenobu-cho, Onsen-gun,

Ehime-ken 791-0204 JAPAN

この欄に記載した者は
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続表に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

10266 弁理士 佐伯 憲生 SAEKI Norio

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi 3-chome,

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

電話番号:

03-5205-2521

ファクシミリ番号:

03-5205-2522

加入電信番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。



第 III 欄の続き その他の出願人又は発明者

この続表を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

田 中 潤 也 TANAKA Junya

〒791-0203 日本国愛媛県温泉郡重信町大字横河原 1 3 7 5

愛大横河原宿舍 1 1 5 号

Suite 115, Ehime University Yokogawara-staff house, 1375,

Oaza Yokogawara, Shigenobu-cho, Onsen-gun, Ehime-ken

791-0203 JAPAN

この欄に記載した者は、
次に該当する：☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

佐 藤 康 二 SATO Kohji

〒433-8118 日本国静岡県浜松市相生町 4 番 1 3 - 5 0 5 号

4-13-505, Aioi-cho, Hamamatsu-shi, Shizuoka-ken

433-8118 JAPAN

この欄に記載した者は、
次に該当する：☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、
次に該当する：☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、
次に該当する：☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続表に記載されている。



• • •

第V欄 国の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと; 少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

広域中等国

- ☐ AP ARIPO 中等国: GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SL シエラ・レオネ Sierra Leone, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ EA ユーラシア 中等国: AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ EP ヨーロッパ 中等国: ~~AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国~~
- ☐ OA OAPI 中等国: BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国 (他の経路の保証又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

国内中等国 (他の経路の保証又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> LR リベリア Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia |
| <input type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| | <input type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input type="checkbox"/> NO ノルウェー Norway |
| <input type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン
Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN 中国 China | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic | <input type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input type="checkbox"/> SL シエラ・レオネ Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada | <input type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GE ギルジア Georgia | <input type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | |
| <input type="checkbox"/> IN インド India | <input type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | <input type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> JP 日本 Japan | <input type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | <input type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa |
| <input type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | <input type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |

下の□は、この様式の旅行後に特許協力条約の締結国となった国を指定するためのものである

- ☐ _____
- ☐ _____
- ☐ _____

指定の確証の宣言: 出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確証を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確証がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。(指定の確証は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確証手数料の納付からなる。この確証は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)



第VI欄 優先権主張

☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先 の 出 願		
		国内出願 : 国 名	広域出願 : * 広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 19.02.99	平成11年特許願 第041517号	日本国 JAPAN		
(2) 30.11.99	平成11年特許願 第340850号	日本国 JAPAN		
(3)				

☒ 上記 () の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の () の番号のものについては、出願書類の認証原本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。 (1) (2)

* 先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択

先の調査結果の利用請求；当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日. 月. 年）

出願番号

国名（又は広域官庁）

ISA / J P

第VIII欄 照合欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 4 枚
 明細書（配列表を除く）..... 36 枚
 請求の範囲 3 枚
 要約 1 枚
 図面 9 枚
 明細書の配列表 枚

合 計 53 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- | | |
|---|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 | 5. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記第VI欄の()の番号を記載する） |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 | 6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する） |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面 |
| 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し | 8. <input type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク） |
| 4. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の説明書 | 9. <input type="checkbox"/> その他（書類名を詳細に記載する） |

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名： 日本語

第IX欄 提出者の記名押印

人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

佐 伯 憲 生



受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日	2. 図面 <input type="checkbox"/> 受理された <input type="checkbox"/> 不足図面がある
3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
5. 出願人により特定された 国際調査機関 ISA / J P	
6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日



P C T

手数料計算用紙

願書附属書

受理官庁記入欄

国際出願番号

受理官庁の日付印

出願人又は代理人の書類記号

J A 9 0 1 3 9 2

出願人

科学技術振興事業団

所定の手数料の計算

1. 及び2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）
第18条第1項第1号の規定による手数料（注1）
（送付手数料「T」及び調査手数料「S」の合計）

95,000 円 T+S

2. 国際手数料（注2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 53 枚

最初の30枚まで

54,800 円 b1

$$\frac{22}{30 \text{ 枚を超える用紙の枚数}} \times \frac{1,300}{\text{用紙1枚の手数料}} =$$

28,600 円 b2

b1及びb2に記入した金額を加算し、合計額をBに記入

83,400 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注3） 4

$$\frac{4}{\text{支払うべき指定手数料の数（上限は10）（注4）}} \times \frac{12,600}{\text{1指定当たりの手数料（円）}} =$$

50,400 円 D

B及びDに記入した金額を加算し、合計額をIに記入

133,800 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

228,800 円

合 計

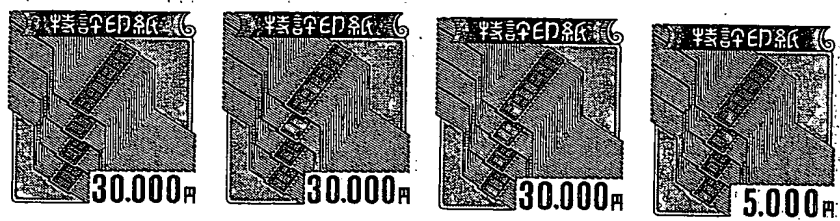
（注1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注3）願書第V欄でレ印を付した口の数。

（注4）指定数を記入する。ただし、10指定以上は一律10とする。





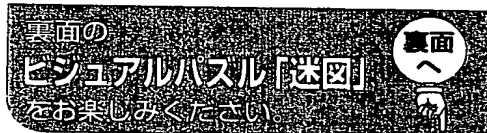
送付手数料・調査手数料 95,000円



ご利用明細

本日はご来店いただきありがとうございます。

年月日	時刻	取扱店番	銀行番号支店番号	口座番号	印紙税申告納付につき廻町
111203	11.37	0222	0022	0632671	
お取引内容	お取引金額	お取扱い	残高	お取扱金額	
お振込	¥133,800*				
ご案内					500円 100円 50円 10円 5円 1円
お受取人 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA 様					
ご依頼人 タクミトツキヨシムシヨ サエキ ノリオ 様 0352052521					
税込手数料 210円をご利用口座からいただきました					



- 残高欄の金額は決済未遂部の証券類を含んでいます。
- 残高の頭部に「-」がある場合は、お借入れ残高を表わします。



東京三菱銀行

基本手数料	83,400円
指定手数料	50,400円
合 計	133,800円



委任状

1999年 9 月 / 日

私儀 弁理士 佐伯 憲生 氏 を代理人と定めて、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願

「ジンセノサイドRb1からなる脳血管再生・再構築促進剤
ならびに神経組織二次変性抑止剤」

に関する一切の件

2. 上記出願及び指定国の指定を取下げる件

3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び選択国の選択を取下げる件



埼玉県川口市本町4丁目1番8号

科学技術振興事業団

理事長 中 村 守 孝





委任状

1999年 11月 / 日

私儀

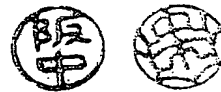
弁理士 (10266) 佐伯 憲生 氏

を以て代理人と定め、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願

「ジンセノサイド Rb1 からなる脳血管再生・再構築促進剤
ならびに神経組織二次変性抑制剤」

に関する一切の件



2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件

3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び
選択国の選択を取り下げる件

あて名 愛媛県温泉郡重信町大字志津川 1191 番地 13

氏 名 阪中 雅広



あて名 愛媛県温泉郡重信町大字横河原 1375
愛大横河原宿舍 115 号

氏 名 田中 潤也





委 任 状

1999年 11月 1日

私儀

弁理士 (10266) 佐伯 憲生 氏

を以て代理人と定め、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願

「ジンセノサイドRb」からなる脳血管再生・再構築促進剤
ならびに神経組織二次変性抑止剤」

に関する一切の件



2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件

3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び
選択国の選択を取り下げる件

あて名 静岡県浜松市相生町4番13-505号

氏 名 佐藤 康二





優先権証明願 (P C T)



特許庁長官 殿

1. 出願番号 平成11年特許願第041517号

2. 請求人

識別番号 100102668

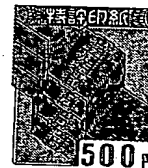
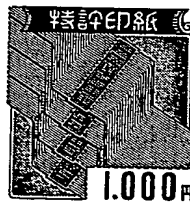
住 所 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目
15番2号
高愛ビル 9階

氏 名 弁理士 佐 伯 憲 生



電話番号 03(5205)2521

3. 出願国名 P C T



(1,500円)



優先権証明願 (P C T)



特許庁長官 殿

1. 出願番号 平成11年特許願第340850号

2. 請求人

識別番号 100102668

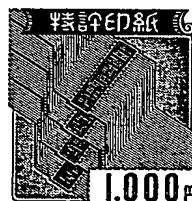
住 所 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目
15番2号
高愛ビル 9階

氏 名 弁理士 佐 伯 憲 生



電話番号 03(5205)2521

3. 出願国名 P C T

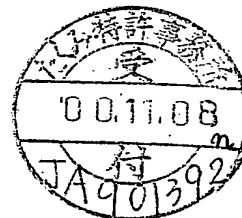


(1,500円)



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）



出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋三丁目15番2号
高愛ビル9階

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)
[PCT規則71.1]

発送日
(日.月.年)

07.11.00

出願人又は代理人
の書類記号

JA901392

重要な通知

国際出願番号

PCT/J P99/06804

国際出願日

(日.月.年) 03.12.99

優先日

(日.月.年) 19.02.99

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）



注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）



特 許 協 力 条 約


P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 JA901392	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/06804	国際出願日 (日.月.年) 03.12.99	優先日 (日.月.年) 19.02.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105, G01N33/15, G0133/15, G01N33/50 // C07J17/00		
出願人 (氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input checked="" type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 14.04.00	国際予備審査報告を作成した日 27.10.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 中木 亜希 	4 P 9282
電話番号 03-3581-1101 内線 3492		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | | | |
|--------------------------|------------|---|-------|--------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2 ☒ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

1) 請求の範囲1-12はジニセリット[®] Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲15-16はジニセリット[®] Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の外傷の悪化のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲27は上記医薬組成物を製造するためのジニセリット[®] Rb₁の使用に係る発明である。

2) 請求の範囲13はジニセリット[®] Rb₁を含有してなる血管の再生又は再構築を促進するための医薬組成物に係る発明である。

3) 請求の範囲14はジニセリット[®] Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の二次変性のための医薬組成物に係る発明である。

4) 請求の範囲17-18はジニセリット[®] Rb₁を含有してなるリゴデント[®] 101のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物に係る発明である。

5) 請求の範囲19-20はジニセリット[®] Rb₁を含有してなる脱髄のための医薬組成物に係る発明である。

6) 請求の範囲21-23はジニセリット[®] Rb₁をリード化合物として神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療のための有効成分を探索する方法に係る発明であり、請求の範囲24は上記方法により得られた治療剤に係る発明であり、請求の範囲25は神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療剤の有効成分を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®] Rb₁の使用に係る発明である。

7) 請求の範囲26は脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®] Rb₁の使用に係る発明である。

上記1)～7)は、ジニセリット[®] Rb₁又はこれをリード化合物として得られる化合物を医薬に適用する技術に関するものであるが、適用疾患はそれぞれ異なるものであり、また、これらが密接な薬理作用に基づくものであるとも言いがたい。したがって、1)～7)に記載した発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められないので、この国際出願は単一性を満たしていると認めることはできない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

☒ すべての部分

☐ 請求の範囲 _____ に関する部分



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-27	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-20, 22, 23, 27	有
	請求の範囲	21, 24-26	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-27	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

国際調査報告で引用された文献は下記

1. JP, 4-504414, A
2. Neuroscience Research, Vol. 28(1997)p. 191-200
3. Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 30, No. 9(1995)p. 674-678
4. Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 17, No. 1(1996)p. 44-48

である。

1) 請求の範囲21, 24, 25について

文献1には、ジンセノサイドR_{b1}がアルツハイマー型老人性痴呆症及び老人性痴呆症の治療に有効であることが記載されており、上記の両痴呆症は神経組織に対する疾患である。

本願出願前、薬物の技術開発分野において、ある特定の薬理活性を有する化合物をリード化合物として用い、該化合物の構造を改変し、種々のスクリーニングを行い、最適又は好適な化合物を選択することは周知技術あることから、ジンセノサイドR_{b1}をリード化合物として用い、アルツハイマー型老人性痴呆症及び老人性痴呆症の治療に有効な化合物を探索し、該化合物を医薬に適用することは、文献1の記載から当業者が容易に成し得たことである。

そして、請求の範囲21, 24及び25に記載された発明において奏せられる効果についても、文献1の記載及び上記周知技術から当業者が予測できないほどの格別顕著な効果が奏せられているとも認められない。

したがって、請求の範囲21, 24及び25に記載された発明は、文献1の記載から進歩性を有しない。

2) 請求の範囲26について

文献2及び3には、ジンセノサイドR_{b1}が神経細胞保護作用を有していることが記載されている。

文献4には、ジンセノサイドR_{b1}が脳保護作用を有していることが記載されている。

本願出願前、薬物の技術開発分野において、ある特定の薬理活性を有する化合物をリード化合物として用い、該化合物の構造を改変し、種々のスクリーニングを行い、最適又は好適な化合物を選択することは周知技術あることから、ジンセノサイドR_{b1}をリード化合物として用い、神経細胞保護作用又は脳保護作用を有する化合物を探索し、該化合物を医薬に適用することは、文献2～4の記載から当業者が容易に成し得たことである。

そして、請求の範囲26に記載された発明において奏せられる効果についても、文



補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

献 2 ～ 4 の記載及び上記周知技術から当業者が予測できないほどの格別顕著な効果が奏せられているとも認められない。

したがって、請求の範囲 26 に記載された発明は、文献 2 ～ 4 の記載から進歩性を有しない。

3) 請求の範囲 1-20, 22, 23 及び 27 について

請求の範囲 1-20, 22, 23 及び 27 に記載された発明は、国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、当業者にとって自明なものでもない。

(請求の範囲 21, 24 及び 25 に関して、本願出願人は、2000年9月18日付け答弁書において、本発明において初めてジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物が、神経組織又は脊髄組織の疾患に対して極めて顕著な格段の作用効果があり、従来の他の有効成分とは明確な相違が見られることから、本発明の有効成分がリード化合物としての地位を与えられるに適したものであることを本発明が初めて開示したものである旨を主張している。しかしながら、ジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物をリード化合物としてどのような化合物を製造し、どのようなスクリーニングを行い、そして、具体的にどのような化合物を神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防又は治療剤として選択したかについては、本願明細書により十分に裏付けされておらず、ジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物自身の上記作用効果の記載が、ジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物のリード化合物として作用効果を裏付けるものとは認められない。

請求の範囲 26 に関して、本願出願人は、2000年9月18日付け答弁書において、本発明において初めてジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物が、脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤として極めて顕著な格段の作用効果があり、従来の他の有効成分とは明確な相違が見られることから、本発明の有効成分がリード化合物としての地位を与えられるに適したものであることを本発明が初めて開示したものである旨を主張している。しかしながら、ジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物をリード化合物としてどのような化合物を製造し、どのようなスクリーニングを行い、そして、具体的にどのような化合物を脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤として使用するかについては、本願明細書により十分に裏付けされておらず、ジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物自身の上記作用効果の記載が、ジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物のリード化合物として作用効果を裏付けるものとは認められない。)



记录
速查 0007

人参皂甙 Rb₁ 和 Rg₁ 对原代培养大鼠海马神经细胞的保护作用

刘 杰 张均田

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 用大鼠海马神经细胞原代培养的实验模型, 观察了人参皂甙 Rb₁ 和 Rg₁ 对原代培养的大鼠海马神经细胞生长的影响。结果发现 Rb₁ 和 Rg₁ 可明显延长培养神经细胞的存活时间、降低神经细胞的死亡率, 并对抗谷氨酸介导的神经毒性作用。实验证明其机制在于选择性抑制大剂量谷氨酸引起的钙离子浓度异常升高。

关键词 人参皂甙 Rb₁, Rg₁; 海马神经细胞; 谷氨酸; 乳酸脱氢酶

细胞是机体的基本组成、结构和功能单位, 在生命科学和医学研究中占越来越重要的地位。随着科学技术的发展, 对作用于神经系统药物的研究, 人们往往在多种层次上进行。在我们早期的研究中发现, 人参皂甙 Rb₁ 和 Rg₁ (Rb₁, Rg₁) 是人参的主要有效成分。它们显示出的多方面生物学活性均有利于“益智强身”, 使机体功能正常化和防治衰老^[1-3]。本研究用神经细胞体外培养技术, 观察 Rb₁ 和 Rg₁ 对海马神经细胞的生长、存活时间、以及对谷氨酸介导的神经毒性的影响。旨在从细胞水平探讨 Rb₁ 和 Rg₁ 促进神经细胞生长和对脑组织的保护作用。

材 料 与 方 法

多聚赖氨酸 (poly-lysine, 分子量大于 30 万) 为美国 Sigma 产品。三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、阿糖胞苷 (cytosine arabinoside)、谷氨酸 (Glu) 为 Fluka 产品。乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒为北京化工二厂产品。人参皂甙 Rb₁ 和 Rg₁ 由广州医药工业研究所提供。

完全 DMEM 培养基: 1 升 DMEM 培养液 (美国 Gibco-BRL 产品) 中含, NaHCO₃ 3.7 g, 青霉素 G 100 U · ml⁻¹, 链霉素 100 μg · ml⁻¹ 及 10% 胎牛血清和 10% 马血清。

Hank 氏液 (mmol · L⁻¹): NaCl 137; KCl 5.0; CaCl₂ 1.3; MgSO₄ · 7H₂O 0.8; Na₂HPO₄ 0.6; KH₂PO₄ 0.4; NaHCO₃ 3.0; Glucose 5.6; pH 7.4。

清洁级 Wistar 雌性大鼠, 孕期 18~20 d, 由中国医学科学院动物繁育场提供。

大鼠海马神经细胞的原代培养^[4] 取孕鼠, 用三氯乙醛 (200 mg/只) 麻醉、无菌操作取出胎鼠, 置于一培养皿中。断头、取脑后, 解剖显微镜下分离出双侧海马, 放入预先加有完全 DMEM 培养液的小烧杯中。培养液洗一次后, 用虹膜剪剪成糜状, 并用吸管吹打成细胞悬液, 经 200 目的金属细胞网过滤。细胞悬液以 4 × 10⁵ cells · ml⁻¹ 的密度接种于预先用 10 μg · ml⁻¹

本文于 1995 年 3 月 27 日收到。

本研究为国家自然科学基金资助, 编号 39370796



的多聚赖氨酸浸泡过夜的 24 孔培养板中(1 ml/孔)。将细胞置 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 用新鲜培养液换洗一次。此时, 各给药组分别加入不同浓度的 Rb₁ 和 Rg₁, 以后每周换两次培养基。第 7 d 时, 在培养基中加入阿糖胞苷(终浓度为 10 μmol · L⁻¹)培养 24 h, 以抑制非神经细胞的继续增殖。接种后的第 14 d 即可按下述处理条件。

谷氨酸(Glu)对培养神经细胞的损伤^[5] 吸去神经细胞的原培养液, 实验组用 Tris 缓冲液洗两次, 加入 Glu(终浓度为 500 μmol · L⁻¹, 用缓冲液配制)。处理 20 min 后去除 Glu, 用无 Glu 的 Tris 缓冲液洗 3 次, 再用完全 DMEM 培养液洗一次, 于每孔中加入 DMEM 培养液 1 ml。对照组除 Tris 缓冲液不含 Glu 外, 处理条件完全同实验组, 经 18~24 h, 镜检并测 LDH。

神经细胞损伤程度的评价

酶学方法:以培养细胞释放 LDH 的量为定量评价神经细胞兴奋性毒性的指标^[6], 即在测定培养液中 LDH 活性后, 置培养细胞于 -20℃, 3 h 以上, 冻融后以同法测定总 LDH, 细胞损伤以培养细胞释放的 LDH 和总 LDH 活力的百分比(LDH%)表示。

形态学方法—台盼蓝(trypsin blue)染色: Glu 作用后 24 h, 室温下将培养细胞的盖玻片用 1.5%台盼蓝染色 10 min, 然后用 0.9%NaCl 液配成的 10%福尔马林(pH 7.0)在 2~4℃下固定, 再用 0.9%NaCl 液洗去福尔马林液, 在显微镜下计多于 500 个细胞, 计算细胞染色的百分比即死亡率。

原代培养的大鼠海马细胞游离钙离子浓度的测定 参照李明方法^[7]进行。Fura-2/AM 负载时神经细胞悬液的密度为 2 × 10⁵ cell · ml⁻¹。为观察 Rg₁ 和 Rb₁ 的作用, 在加入 Glu 前, 先加入不同浓度的 Rb₁ 和 Rg₁ 与海马细胞先温浴 10 min, 再同法测细胞的荧光强度, 并计算细胞内游离钙离子的浓度。

结 果

Rb₁ 和 Rg₁ 对培养神经细胞生长和存活时间的影响

形态学观察发现, 接种的细胞最初呈圆形; 接种 1~2 h 几乎全部贴附于多聚赖氨酸处理过的小盖玻片和培养板壁。此时细胞分散, 相差显微镜下观察细胞呈现强折光的胞体, 核不可见。此后, 细胞伸出细丝状带有分枝的突起, 并交织成网状。细胞多呈双极型、三极型、少数呈单极型。培养第七天时, 经阿糖胞苷处理后, 胶质细胞的生长受到明显抑制, 但神经细胞不受影响。细胞形态变化于第 14~15 天达到成熟。第 18~20 天开始退化, 细胞折光性下降, 胞浆内颗粒增多, 突起松弛并逐渐自盖玻片附着点脱落。

将终浓度为 1 和 10 μmol · L⁻¹ 的 Rb₁ 和 Rg₁ 单独加入培养液中, 作连续镜下观察, 结果在培养的初期至第 15 天, 神经细胞的生长与对照组比较, 均未见明显差异, 表明 Rb₁ 和 Rg₁ 对神经细胞的生长无明显影响。但将神经细胞与上述浓度的 Rb₁ 和 Rg₁ 药液共同培养至第 24 天时, 用台盼蓝染色, 显微镜下对染色阳性的神经细胞进行计数, 发现 Rb₁ 和 Rg₁ 均可明显降低细胞死亡率、延长培养神经细胞的存活时间(图 1)。



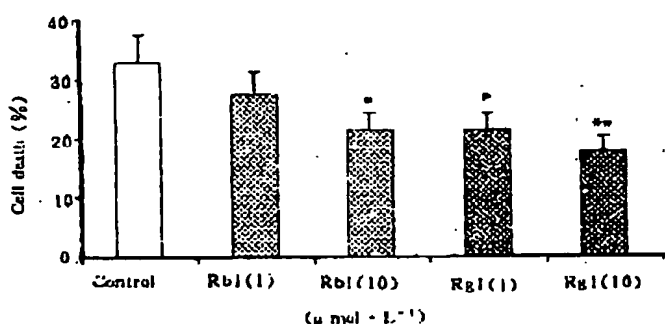


Fig 1 Effects of Rb₁ and Rg₁ on the neuron survival of cultured rat hippocampal cells cultured for 24 days. $n=6$, $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

Rb₁ 和 Rg₁ 对 Glu 介导的神经毒性的影响

将培育 14 d 的海马神经细胞暴露于 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glu 后,相差显微镜下观察,细胞折光度下降,颗粒增加;生化检测发现,培养液中 LDH 释放率明显增加;台盼蓝染色显微镜下检查,细胞的死亡率也明显升高,表明该浓度下的 Glu 对培养的神经细胞造成了较强的神经毒性。将不同浓度的 Rb₁ 和 Rg₁ 与海马神经细胞共同培养 13 d 后,再加 Glu 进行处理,结果 Rg₁ 对 LDH 的释放影响不显著,但可使细胞死亡率明显降低($P < 0.05$)。与 Rg₁ 相比,Rb₁ 在降低神经细胞死亡率的同时,还使 LDH 释放率减少,表现出较强的对神经细胞的保护作用(表 1)。

Tab 1 Effects of ginsenoside Rg₁ and Rb₁ on glutamate (Glu)-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons

Group (μmol · L ⁻¹)	LDH (%)	Death (%)
Control	15.1 ± 4.93	7.1 ± 1.43
Glu (500)	48.5 ± 9.57*	62.3 ± 13.62*
Rg ₁ (1)	46.2 ± 8.29	55.3 ± 11.53
Rg ₁ (10)	40.8 ± 7.64	40.7 ± 9.42*
Rg ₁ (100)	42.5 ± 8.03	41.6 ± 10.81
Rb ₁ (1)	41.1 ± 9.18	50.9 ± 11.73
Rb ₁ (10)	35.8 ± 7.63*	38.6 ± 9.01*
Rb ₁ (100)	38.5 ± 7.49	42.6 ± 10.46*

$n=5$, $\bar{x} \pm s$ * $P < 0.05$ vs control, * $P < 0.05$ vs Glu group

Rg₁ 和 Rb₁ 对 Glu 介导的海马神经细胞内钙离子浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的影响

静息状态下,海马细胞游离 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $237 \pm 34 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=60$),但分别加入 Glu 100 和 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显升高,大剂量的 Glu 几乎使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高近 3 倍,提示 Glu 导致细胞中毒的原因与细胞内钙超载有关。为观察 Rb₁ 和 Rg₁ 的效应,在给 Glu 之前,先分别将 Rb₁ 和 Rg₁ 药液(终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与细胞温浴 10 min,结果 Rg₁ 及 Rb₁ 对低浓度 Glu 的升钙效应无明显影响,但却可显著降低大剂量 Glu 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。与 Rg₁ 相比,Rb₁ 的降钙效应更显著(表 2)。



Tab 2 Effects of ginsenoside Rb₁ and Rg₁ on cultured hippocampal cell [Ca²⁺]_i induced by glutamate (Glu)

Group (μmol · L ⁻¹)	[Ca ²⁺] _i (nmol · L ⁻¹)
Control	237 ± 34
Glu (100)	378 ± 69 [*]
Glu (500)	689 ± 104 ^{**}
Glu (100) + Rb ₁ (10)	356 ± 58
Glu (100) + Rg ₁ (10)	369 ± 64
Glu (500) + Rb ₁ (10)	508 ± 87 ^{""}
Glu (500) + Rg ₁ (10)	624 ± 92 ^{""}

n=6, $\bar{x} \pm s$. * P<0.05, ** P<0.01 vs control (n=60); "" P<0.05, "" P<0.01 vs Glu (500 μmol · L⁻¹)

讨 论

神经细胞的原代培养是近几十年才建立和发展的一种实验技术。用离体培养不同脑组织的神经细胞进行实验,可排除整体动物或脑片模型造成的实验误差,更清楚地了解药物对神经元的损伤或保护作用。形态学观察发现,Rb₁和Rg₁对神经细胞的生长无明显影响,但可明显降低衰老神经细胞的死亡率,延长细胞的存活时间。

谷氨酸(Glu)是哺乳动物和人脑内含量最高的游离氨基酸,对神经元有极强的兴奋作用^[8]。近年来大量实验证实了过量的Glu有神经毒作用^[9]。研究发现,过量的Glu与NMDA受体结合后,引起兴奋性神经元持续去极化,干扰神经元的调节机制,钙离子通过电压依赖性的钙通道或NMDA受体偶联的通道缓慢内流,造成细胞内钙离子超载,引起细胞坏死。电镜观察表明,在受兴奋性氨基酸毒性作用的细胞中有大量的钙积聚。因此人们普遍认为,细胞内钙离子超载是Glu引起细胞死亡共同的病理生理学机制^[10]。

本研究以培养14 d的神经细胞为研究对象,观察了Glu对大鼠海马神经元的毒性作用。结果发现神经细胞经Glu 500 μmol · L⁻¹处理后,细胞的折光度下降、LDH释放率明显增加、细胞的死亡率也明显升高,表明该浓度下的Glu对培养的大鼠海马神经元有较大的毒性作用。以此为对照,将不同浓度的Rb₁和Rg₁与神经细胞共同培养13 d后,再加Glu进行处理,结果Rg₁对LDH释放百分率无明显影响,但可使细胞死亡率明显降低;而Rb₁能使LDH的释放百分率和神经细胞的死亡率均明显降低,表现出较强的对神经细胞的保护作用。

采用Fura-2荧光检测技术发现,Glu可引起[Ca²⁺]_i高水平持续的升高,尤其是Glu浓度加大的时候。给予Rb₁和Rg₁后,尽管对Glu 100 μmol · L⁻¹的升钙作用无明显影响,但却可使Glu 500 μmol · L⁻¹介导的[Ca²⁺]_i升高的效应明显降低,从而体现了人参“扶正固本,协调平衡”的良好特性。本研究的意义不仅在形态学和生化水平上观察Rg₁和Rb₁对神经细胞生长、存活的影响,而且从分子水平上阐明了Rg₁和Rb₁对抗Glu介导的神经毒作用的机制,即选择性降低异常升高的细胞内游离钙离子的浓度。

参 考 文 献

- 1 张均田,刘云,屈志伟等. 人参皂甙Rb₁和Rg₁对小鼠中枢神经递质受体和脑内蛋白质合成的影响. 药理学



- 报, 1989, 23: 12
- 2 张磊, 张均田. 人参和三七对小鼠记忆的易化作用. 中西医结合杂志, 1987, 7: 610
 - 3 杨迎, 张均田, 石成璋等. 人参皂甙 Rb_1 和 Rg_1 促智作用机制的探讨——对小鼠脑神经发育的影响. 药理学报, 1994, 29: 241
 - 4 Banker GA, Cowan WM. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res*, 1977, 126: 397
 - 5 Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*, 1987, 7: 357
 - 6 Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurochem Methods*, 1987, 20: 83
 - 7 李明, 王峻峰, 韩济生等. 应用 Fura-2/AM 检测分离的神经细胞内游离钙离子及其变化. 药理学报, 1991, 26: 890
 - 8 Frandsen A, Schousboe A, Griffiths R. Cytotoxic actions and effects on intracellular Ca^{2+} and cGMP concentration of sulphurcontaining excitatory amino acids in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurosci Res*, 1993, 34: 331
 - 9 Choi DW. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron*, 1988, 1: 623
 - 10 Frandsen A, Schousboe A. Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *Int J Dev Neurosci*, 1990, 8: 209

PROTECTIVE EFFECTS OF GINSENSOSIDE Rb_1 AND Rg_1 ON CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

M Liu and JT Zhang

(Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy
of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

ABSTRACT It has been well documented that ginsenoside Rb_1 and Rg_1 are important active principles of ginseng. In the present studies, Rb_1 and Rg_1 were found to prolong the duration of neuronal life and provided partial protection against the excitotoxic effect of glutamate in primary hippocampal cultures. Since excitotoxic neuronal injury of glutamate is considered to be caused by the increase of intracellular Ca^{2+} concentrations, the effects of Rb_1 and Rg_1 on $[Ca^{2+}]_i$ elevated by glutamate were measured in cultured hippocampal cells using Fura-2/AM as a calcium indicator. The results showed that Rb_1 and Rg_1 could selectively inhibit the high level glutamate ($500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) induced increase of $[Ca^{2+}]_i$, suggesting that the neuroprotective activities of Rb_1 and Rg_1 were mediated by blocking calcium over-influx into neuronal cells.

Key words Ginsenoside Rb_1 and Rg_1 ; Hippocampal neurons; Glutamate; Lactic dehydrogenase



PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 A61K 31/704, 45/00, A61P 25/00, 43/00, G01N 33/15, 33/50 // C07J 17/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/48608 (43) 国際公開日 2000年8月24日(24.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06804 (22) 国際出願日 1999年12月3日(03.12.99) (30) 優先権データ 特願平11/41517 1999年2月19日(19.02.99) JP 特願平11/340850 1999年11月30日(30.11.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 阪中雅広(SAKANAKA, Masahiro)[JP/JP] 〒791-0204 愛媛県温泉郡重信町大字志津川1191番地13 Ehime, (JP) 田中潤也(TANAKA, Junya)[JP/JP] 〒791-0203 愛媛県温泉郡重信町大字横河原1375 愛大横河原宿舍115号 Ehime, (JP) 佐藤康二(SATO, Kohji)[JP/JP] 〒433-8118 静岡県浜松市相生町4番13-505号 Shizuoka, (JP)		(74) 代理人 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CN, KR, US, 欧州特許 (CH, DE, FR, GB, IT) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: CEREbroVASCULAR REGENERATION/RECONSTRUCTION PROMOTERS AND NERVE TISSUE SECONDARY DEGENERATION INHIBITORS COMPRISING GINSENOside RB₁ (54) 発明の名称 ジンセノサイドRb ₁ からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤 (57) Abstract Efficacious preparations for intravenous administration containing ginsenoside Rb ₁ or its salt which are useful as vascular regeneration/reconstruction promoters and nerve tissue secondary degeneration inhibitors. These preparations are useful particularly in regenerating and reconstructing the cerebrovascular network after cerebral stroke and inhibiting nerve tissue secondary degeneration.		

本発明は血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤として有用なジンセノサイドRb₁又はその塩の有効な静脈内投与用製剤を提供する。

本発明は、ジンセノサイドRb₁又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤に関し、特に脳卒中後の脳血管網の再生・再構築および神経組織二次変性の抑止のために有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

ジンセノサイド Rb₁ からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤

技術分野

本発明は、ジンセノサイド Rb₁ もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、神経組織の損傷による神経組織の二次変性、脊髄損傷、頭部外傷、神経組織又は脊髄組織の外傷による疾患、脱髄を伴う神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の医薬組成物に関する。また、本発明は、ジンセノサイド Rb₁ もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる血管の再生又は再構築の促進、又はオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止させるための医薬組成物に関する。本発明は、血管再生・再構築促進剤あるいは神経組織二次変性抑止剤として有用なジンセノサイド Rb₁ 又はその塩にも関する。

また、本発明は、前記疾患の予防、処置又は治療用の静脈内投与用製剤に関する。さらに、本発明は、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置若しくは治療のための有効成分、又は脳細胞保護剤若しくは神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物の使用に関する。

背景技術

元来脳卒中（脳血管障害）の治療法は、脳梗塞（脳血栓・脳塞栓）・脳出血・一過性脳虚血発作・クモ膜下出血で異なっており、厳密には脳の CT 検査を実施しなければ有効な対策が立てられないのが現状である。たとえば血栓溶解剤などは一過性脳虚血発作や脳梗塞（脳血栓・脳塞栓）に使用され、脳出血には禁忌とされている。しかし、脳卒中は可及的すみやかに病巣部位の神経細胞を保護する処置がとられなければ、以後永久に高次機能障害をもたらすかあるいは生命予後

に影響を与える重篤な疾患であるので、一刻も早く治療を開始すべき疾患である。極論を言えば、脳のCT検査を実施している時間すら、脳卒中患者にとって回復する可能性を少なくする要因になるのである。まさに急性期脳卒中の治療は脳卒中病変のみならず発症後の時間との戦いと言っても過言ではない。ただ、残念ながら、目下の所、脳卒中の病型（脳梗塞・脳血栓・脳塞栓・脳出血・クモ膜下出血・一過性脳虚血発作）の如何を問わず、脳卒中を発症したと思われる患者に速やかに投与し、著効を示す薬物がほとんど存在しないのが実情である。

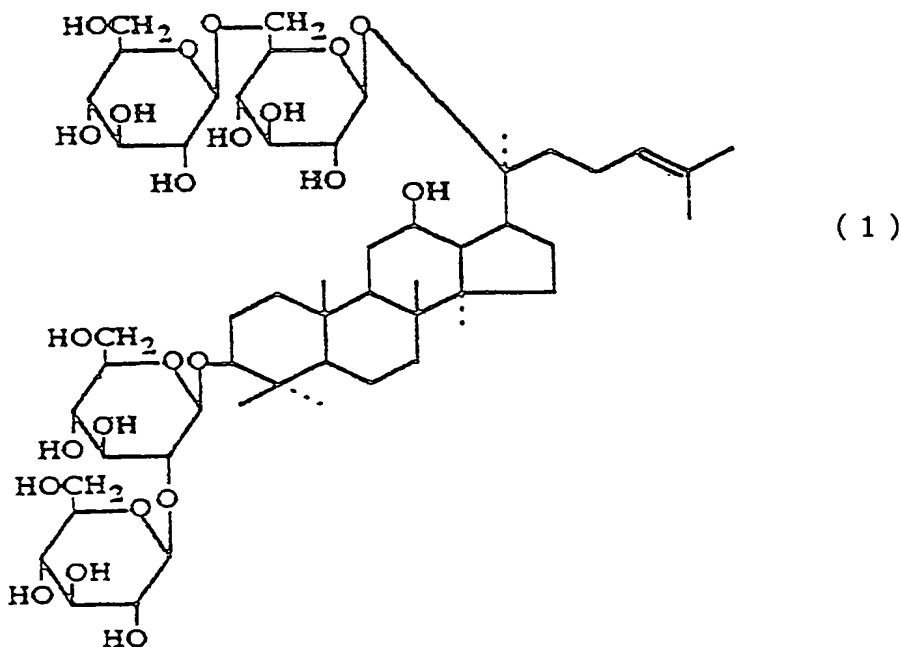
脳卒中の治療で問題になるのは上記のごとく急性期ばかりではない。たとえ、ある強力な神経保護薬の投与により、一時的に脳細胞（グリア細胞を含む）あるいは神経細胞の壊死あるいはアポトーシス様細胞死を防ぐことができて、その後障害部位における脳血管の再生や再構築が生じなければ、長い時間を経てやがては同部位の脳細胞や神経細胞が変性脱落する可能性がある。しかし、現状では脳血管の再生や再構築を促進する薬物もほとんどない。中大脳動脈皮質枝（MCA）が永久閉塞した脳梗塞病変を例にとって、もう少しこのことについて以下に具体的に説明する。MCAが永久閉塞するとMCAだけで栄養されている部位すなわち虚血中心部（ischemic core）の神経細胞はMCAが再開通しない限り、すみやかに壊死に陥り脳梗塞病変が形成されるので、いかなる薬物といえども虚血中心部の脳組織を救うことはまず出来ないと考えられる。なお、特願平10—365560号及びPCT/J P 99 / 0 2 5 5 0（「ジンセノサイドRb1からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）で既述したごとく、本明細書では、ネクロシス（壊死）とは異なり緩徐に進行する神経細胞の死を「神経細胞のアポトーシス」あるいは「アポトーシス様神経細胞死」と定義することにする。

一方、虚血巣周辺部（ischemic penumbra）ではMCAからの血液供給がまったくなくなり同部における血管網は著しく少なくなるが、わずかながらも前大脳動脈や後大脳動脈の皮質枝からの血液供給があるので、同部の神経細胞はMCA永久閉塞後しばらくは瀕死の状態で生きていると考えられている。もちろん何の手だても施さなければ、虚血巣周辺部でやがてアポトーシス様神経細胞死が起こり、同部がすべて脳梗塞病変に様変わりすることは周知の事実である。臨床的にはこの虚血巣周辺部（ischemic penumbra）の神経細胞を救うことが最も大切であるが、

上述のごとく強力な神経保護薬で一時的に同部の神経細胞を生かすことができて、その後MCA永久閉塞により破綻あるいは減少した同部の血管網が再生・再構築されない限り、同部の神経細胞は時間をおいて死に至る可能性が高い。従って、神経保護薬に求められる条件として、神経細胞への直接の保護作用に加えて、破綻した虚血巣周辺部血管網の再生・再構築を促すことがあげられる。

今ひとつ脳卒中の治療で問題になるのは、脳の組織学的特徴である。脳内各領域はシナプスを介して互いに複雑な情報ネットワークを形成しているので、ある領域が障害を受けるとその領域とシナプス連絡（あるいは線維連絡ともいう）を有する他の領域でも時間をずらして障害が進行することがよくある。たとえば、一側大脳皮質に脳梗塞病巣（一次病変）が生じると、その後脳梗塞病巣と密なシナプス連絡を有している同側視床で神経細胞死（二次変性）が起こり、同側視床の萎縮が進行するにつれて脳血管性痴呆も悪化することが報告されている。しかも、同側視床が萎縮してその機能が損なわれると、視床とシナプス連絡を有する他の領域でも三次変性が起こり始め、脳卒中患者の脳機能は月日を経るごとに低下し続ける可能性が高い。このような、脳の組織学的特徴に基づく悪循環を断つためには、上記のような二次変性を抑止する薬物が必要である。

ところで、ジンセノサイドR b₁は下記構造式(1)



で示される化合物であり、ジンセノサイド R b₁ は柴田ら (Shibata S., et al., Economic and medicinal plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985) などにより公知の物質である。

ジンセノサイド R b₁ は向神経作用としてその腹腔内投与によりこれまで静穏作用のみが報告されてきたが (Yoshimura H. et al., Eur. J. Pharmacol., 146, 291-287, 1988)、その作用機序についてはまったく解明されていない。また、中枢神経系においては、ジンセノサイド R b₁ とジンセノサイド R g₁ の混合物あるいは 10^{-6} M から 10^{-7} M という高濃度のジンセノサイド R g₁ またはジンセノサイド R b₁ がアセチルコリン含有神経細胞を活性化し、アルツハイマー病に効能を示す可能性があることが報告されているが (米国特許: U S A, 5, 137, 878号: Composition and method for treatment of senile dementia)、アセチルコリン細胞の機能障害がアルツハイマー病の主要所見であるとは言い難いので、この仮説には解決すべき問題が山積みしている。しかも前記の米国特許文献は、ジンセノサイド R b₁ がアセチルコリン含有神経細胞の生存を延長するか否か、すなわちアセチルコリン細胞を保護するか否かという課題には言及していない。

ジンセノサイド R b₁ の神経細胞保護作用については、本発明者ら (阪中、田中) がジンセノサイド R b₁ の研究を手掛けるまではほとんど解明されていなかった。本発明者ら (阪中、田中) はこれまでジンセノサイド R b₁ が神経細胞保護効果を発揮するかどうかを、スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いて調べてきた。この脳虚血モデル動物では、脳温を 37°C に維持した状態で3分間から5分間、総頸動脈血流を遮断すると、血流遮断時間に応じて虚血後1週間以内に海馬 C A 1 錐体神経細胞 (アセチルコリン非含有) が変性脱落し (これを遅発性神経細胞死という)、同動物の学習行動機能も低下することが証明されている (Wen T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996)。すなわち、スナネズミの一過性前脳虚血モデルはヒトの一過性脳虚血発作の病態を反映すると言える。

本発明者の1人 (阪中) は、スナネズミの腹腔内にあらかじめジンセノサイド R b₁ (10 mg/kg/日 または 20 mg/kg/日 、スナネズミの体重を約 70 g としておよそ 0.7 mg/日 または 1.4 mg/日) を1日単回1週間注入しておく、5分間の総頸動脈血流遮断による遅発性神経細胞死と学習行動障害

が有意に軽減されることを証明した (Wen T.-C. et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996)。しかしながら、5分間あるいは3分間の総頸動脈血流遮断直後に、ジンセノサイド Rb₁を腹腔内に注入しても効果はみられなかった (Wen T.-C. et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996; Lim J.-H. et al., *Neurosci. Res.*, 28, 191-200, 1997)。従って、この時点で末梢 (腹腔内) 投与されたジンセノサイド Rb₁の脳内移行率および移行速度は非常に低いことが予想されたため、ジンセノサイド Rb₁は海馬 CA1 錐体神経細胞の保護という観点からは、臨床応用の可能性は皆無と考えられた。

前記のような末梢 (腹腔内) 投与に代えて、ジンセノサイド Rb₁を3分間あるいは3.5分間の総頸動脈血流遮断の直後に、直接脳室内に持続注入すると遅発性神経細胞死と学習行動障害が抑止されることが、発明者ら (阪中、田中) により報告されている (Lim J.-H. et al., *Neurosci. Res.*, 28, 191-200, 1997)。さらに、脳卒中易発症高血圧自然発症 (SH-S P) ラットの中大脳動脈皮質枝 (MCA) 永久閉塞モデル (脳梗塞ラットもしくは脳塞栓ラット) においても、ジンセノサイド Rb₁をMCA永久閉塞直後より脳室内へ持続注入すると、大脳皮質梗塞巣が有意に縮小し、同動物の場所学習障害も軽減されることを、発明者ら (阪中、田中) は証明した (Zhang B. et al., *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, 7, 1-9, 1998)。

しかしながら、ペプチド性因子の脳室内注入を用いた発明者らの研究成果が臨床応用されないことと同様に (Sakanaka M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95, 4635-4640, 1998; Wen T.-C. et al., *J. Exp. Med.*, 188, 635-649, 1998)、たとえジンセノサイド Rb₁が脳室内への直接投与で効果を示しても投与経路の問題からやはりヒトの一過性脳虚血発作や脳梗塞症例にジンセノサイド Rb₁を応用することはこれまで不可能と考えられてきた。

また、ジンセノサイド Rb₁の末梢 (腹腔内) 投与による神経細胞保護作用のメカニズムについて、本発明者ら (阪中、田中) は、これまでに低濃度 (1~100 fg/ml) の同薬物をあらかじめ培養液に混入しておく、ヒドロキシルラジカル誘発剤 (硫酸第一鉄) による神経細胞の壊死 (ネクローシス) が軽減されることを報告している (Lim J.-H. et al., *Neurosci. Res.*, 28, 191-200, 1997)。

7; Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998)。本発明者らは、ジンセノサイドRb₁がヒドロキシルラジカルを消去することにより、細胞膜の過酸化脂質を減少せしめ、培養神経細胞を保護するものと当初より推測してきたが、この仮説が必ずしも正しくないことが、発明者らの最近の研究（特願平10—365560号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）で判明した。この詳細については後述する。

また、高濃度（0.11～11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）のジンセノサイドRb₁がグルタミン酸の神経毒性を軽減して神経細胞死を予防すること（Kim Y.-C., et al., J. Neurosci. Res., 53, 426-432, 1998）、あるいは500 μM （550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）という高濃度のジンセノサイドRb₁がアポトーシス様神経細胞死を予防する可能性があること（田中知明ら、The Ginseng Review, 24, 61-65, 1998; 瀧野一郎ら、The Ginseng Review, 25, 44-50, 1998）が培養実験で報告されているが、高濃度のジンセノサイドRb₁は本発明者ら（阪中、田中）の培養実験によれば必ずしも神経栄養作用を示さないことが判明している（Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。

しかも、このように高濃度のジンセノサイドRb₁を生体組織内の細胞外液で再現することは極めて困難であるのみならず、コスト面や副作用出現の可能性を考えても大量のジンセノサイドRb₁を生体に投与することは不可能である。実際、これまでの本発明者ら（阪中、田中）の実験結果からも、高用量のジンセノサイドRb₁は生体にとって必ずしも好ましい効果・効能をもたらさないことが判明している（Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。

発明者らは、ジンセノサイドRb₁による神経細胞保護作用のメカニズム解明、同化合物の新たな効能・利用可能性の発明を目指して、低濃度ジンセノサイドRb₁の神経細胞死抑止効果をこれまで明らかにしてきた（特願平10—365560号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）。その結果、ジンセノサイドRb₁が1 fg/ml から100 fg/ml という世界に類をみない低濃度域で、細胞死抑制遺伝子

産物 B c l - x_L の発現増加を促すことによりアポトーシス様神経細胞死を抑止することを見出した。

すなわち、ジンセノサイド R b₁ は世界で唯一の非ペプチド性の B c l - x_L 発現増強剤であることが見出された。また、100 f g / m l の濃度ではわずかにジンセノサイド R b₁ の過酸化脂質生成抑制効果はみられたが、それよりも低い濃度域ではそのような効果はみられなかった。従って、ジンセノサイド R b₁ の作用機構に関する従来の仮説、すなわちジンセノサイド R b₁ は細胞膜の過酸化脂質を減少せしめることにより神経細胞を保護するという仮説、は妥当ではないことが判明した。

本発明者らはさらにジンセノサイド R b₁ が静脈内投与により、これまでまったく予想すらされなかった優れた脳梗塞抑止作用ならびに場所学習障害改善作用を示すこともすでに見出している（特願平 10—365560 号、P C T / J P 99 / 02550、いずれも「ジンセノサイド R b₁ からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）。

しかしながら、ジンセノサイド R b₁ の静脈内投与が終了した後でも、もし同化合物投与により脳梗塞に陥ることを免れていた脳組織中、すなわち虚血巣周辺部、で血管の再生や再構築が起きていなければ、ジンセノサイド R b₁ 投与終了後に時間をおいて同部で新たな脳障害が出現する可能性が高い。また、ジンセノサイド R b₁ の静脈内投与により大脳皮質の一次梗塞病変が縮小しても、大脳皮質と密なシナプス連絡を有する視床の二次変性が抑止されていなければやはりジンセノサイド R b₁ 静脈内投与の効果・効能も充分に発揮されないこともあり得る。

本発明者らは、ジンセノサイド R b₁ が静脈内投与により、虚血巣周辺部（ischemic penumbra）における血管網の再生および再構築を促進することを見出し本発明を完成した。また、本発明者らは、ジンセノサイド R b₁ が静脈内投与により、大脳皮質梗塞後に生じる視床の二次変性ならびに脊髄損傷後に生じる神経組織の二次変性を抑止することを見出し本発明を完成した。

発明の開示

本発明の目的は脳卒中後の静脈内投与により優れた脳血管再生および再構築促

進作用を示し、かつ神経組織の二次変性を抑止することにより障害を受けた脳を長期的に保護する薬物を提供することである。

また、本発明は脳卒中後の脳血管再生・再構築促進剤あるいは神経組織二次変性抑止剤として有用なジンセノサイドRb₁又はその塩の有効な投与用製剤を提供する。より詳細には、ジンセノサイドRb₁若しくはその塩を含有してなる脳血管再生・再構築促進用医薬組成物、又はジンセノサイドRb₁若しくはその塩を含有してなる神経組織二次変性抑止作用を示す医薬組成物を提供するものである。また、本発明は、ジンセノサイドRb₁若しくはその塩を含有してなる脳・神経疾患の長期にわたる治療、予防又は処置などのために有用な静脈内投与用製剤を提供するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、ジンセノサイドRb₁を静脈内に注入したラットを用いた水迷路テストの結果を示す図である。第1図の左側は中大脳動脈永久閉塞後2週目の結果であり、同右側は中大脳動脈永久閉塞後4週目の結果である。また、第1図中の黒丸印(●)は偽手術をしたラットのものであり、白丸印(○)は手術後、生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印(■)はジンセノサイドRb₁を6 μ g/日投与したものであり、白四角印(□)はジンセノサイドRb₁を60 μ g/日投与したものである。なお、データはmeans \pm SEで表示されており、統計解析法はANOVA+ FisherのPLSDによる。

第2図は、ジンセノサイドRb₁を静脈内に注入したラットにおける大脳皮質梗塞比率を示す図である。なお、データはmeans \pm SEで表示されており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによる。

第3図は、大脳皮質梗塞巣を示す図面に代わる写真である。Aが生理食塩水投与例、BがジンセノサイドRb₁投与例である。

第4図は、実施例1、2、3の結果をまとめた模式図である。

第5図は、5 μ m厚脳切片に占める頭頂葉梗塞巣周辺部の血管面積測定域を示す図である。

第6図は、健常側(対照側)ならびに虚血側の梗塞巣周辺(すなわち虚血巣周

辺部)を示す図面に代わる微分干渉顕微鏡写真である。

第7図は、視床VP核を示す図面に代わる光学顕微鏡写真を示す。Aが偽手術動物のもの、Bが生理食塩水投与虚血動物のもの、CがジンセノサイドRb₁(60 μ g/日)投与虚血動物のものである。バーは100 μ mを示す。

第8図は、脊髓(下位胸髄)損傷後2日目のラットを示す図面に代わる写真である。Aが生理食塩水投与例であり、BがジンセノサイドRb₁(60 μ g/日)静脈内投与例である。

(以下余白)

第9図は、脊髄損傷後7日目における、生理食塩水投与ラット、及びジンセノサイドRb₁ (12 μ g/日、60 μ g/日) 投与ラットのBBBスコア (score) を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、神経組織の損傷による神経組織の二次変性、脊髄損傷、神経組織又は脊髄組織の外傷による疾患、脱髄などの神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の医薬組成物に関する。

本発明のジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩は、血管の再生又は再構築の促進作用、又はオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑制する作用を有し、したがって、本発明は、血管再生・再構築促進剤、好ましくは脳卒中後の脳血管再生・再構築の促進剤、神経組織の二次変性の抑止剤、又は、オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死の抑制剤にも関する。

また、本発明は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患を血管の再生又は再構築の促進作用、好ましくは脳卒中後の脳血管再生・再構築を促進する作用、又はオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑制する作用により予防、処置又は治療するための医薬組成物に関する。

さらに、本発明は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる血管の再生又は再構築を促進させるための医薬組成物、神経組織の二次変性の予防、処置又は治療用医薬組成物、神経組織又は脊髄組織の外傷の予防、処置又は治療用医薬組成物、オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止させるための医薬組成物、脊髄損傷の予防、処置又は治療用医薬組成物、及び、脱髄の予防、処置又は治療用医薬組成物に関する。

また、本発明は、ジンセノサイドRb₁又はその代謝産物が神経組織又は脊髄組

織の疾患に対する予防、処置又は治療に極めて有効であることを見出したものであり、したがって本発明はジンセノサイドRb₁又はその代謝産物をリード化合物として、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索する方法に関する。

さらに、本発明は、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイドRb₁又はその代謝産物の使用、及び、脳細胞保護剤または神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイドRb₁又はその代謝産物の使用に関する。本発明は、前記した方法または使用により得られた神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療剤にも関する。

さらに、本発明は、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用医薬組成物を製造するためのジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用、並びに、血管の再生又は再構築を促進させるための医薬組成物、神経組織の二次変性の予防、処置又は治療用医薬組成物、神経組織又は脊髄組織の外傷の悪化予防、処置又は治療用医薬組成物、オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止させるための医薬組成物、脊髄損傷の悪化予防、処置又は治療用医薬組成物、及び、脱髄の予防、処置又は治療用医薬組成物を製造するためのジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の医薬組成物は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなるものが好ましい。また、本発明の医薬組成物は、静脈内投与や粘膜投与などの非経口投与形態のものが好ましい。より詳細には、本発明の医薬組成物は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなる非経口投与製剤が好ましい。

また、本発明は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を好ましくは低濃度で含有してなる前記疾患の予防、処置又は治療用の非経口投与製剤、好ましくは静脈内投与用製剤に関する。

これらの本発明の医薬組成物は、静脈内投与用製剤が好ましいが病変部局所外

用剤、病変部局所注射剤、経口投与製剤、点鼻薬、点眼薬、坐薬、皮下注射薬、皮内注射薬、筋肉注射薬、吸入薬、舌下薬、経皮吸収薬等、任意の投与経路が選択できる。

また、本発明は前記の静脈内投与用製剤又は病変部局所外用剤などからなる脳・神経疾患の長期にわたる治療、予防、若しくは処置剤、又は脳血管再生・再構築促進剤もしくは神経組織の二次変性抑止剤に関する。

また、本発明者らは、ジンセノサイド Rb₁又はその代謝産物が、血管の再生又は再構築の促進作用、特に脳卒中後の脳血管再生・再構築の促進作用、又はオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑制する作用を有することを初めて見出したものであり、したがって、本発明は、ジンセノサイド Rb₁又はその代謝産物を神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の他の有効成分を探索するためのリード化合物として使用することができることを提供するものである。また、ジンセノサイド Rb₁の化学構造の一部を修飾してプロドラッグを作成したのちに、任意の投与経路を選択することも可能である。さらに、ジンセノサイド Rb₁もしくはその代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脊髄損傷・神経外傷・外傷治療薬の開発を目指すこともできる。

したがって、本発明は、これらの疾患の新しい予防、処置又は治療用の有効成分を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイド Rb₁又はその代謝産物を提供するものでもある。

本発明のジンセノサイド Rb₁は前記した構造式で示されるものであり、ジンセノサイド Rb₁は、例えば、柴田ら (Shibata S. et al., Economic and medicinal Plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985) の方法に準じて分離・精製することができる。このような方法により精製されたものはその純度が98%以上であることが、薄層クロマトグラフィーならびに核磁気共鳴スペクトルにより確認されている (Kawashima Y. and Samukawa K., J. Med. Pharmacol. Soc. Wakan-Yaku, 3, 235-236, 1986)。

本発明のジンセノサイド Rb₁は遊離のものを使用することもできるが、それを

適当な塩と使用することもできる。また、それらの水和物のような溶媒和物として使用することもできる。

本発明のジンセノサイドRb₁の濃度は、特願平10—365560号及びPCT/JP99/02550（「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）で記述されたごとく低濃度が好ましく、より具体的には、細胞外液濃度が1 ng/ml以下、好ましくは1 pg/ml以下、より好ましくは100 fg/ml以下となる濃度である。本発明のジンセノサイドRb₁を、静脈内投与用製剤として使用する場合にも、患者の患部における細胞外液濃度が前記の濃度になるように製剤を調整することが好ましい。本発明の医薬組成物や製剤は、患部組織の細胞外液濃度が1～100 fg/ml程度でも十分な効果が得られる。

静脈内投与されたジンセノサイドRb₁は、従来の末梢（腹腔内）投与によるものとは異なり、脳・神経系に速やかに伝達されることがすでに見出されている（特願平10—365560号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）。本発明の静脈内投与用製剤は、血管内、好ましくは静脈に直接投与できるものであればよく、生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液、リボソーム、脂肪乳剤等に溶解したのちに、単回静脈内注入用製剤もしくは静脈内持続投与用製剤として使用できる。また、点滴用組成物などの静脈投与製剤に添加して使用できる剤形であってもよい。また、ジンセノサイドRb₁の化学構造の一部を修飾してプロドラッグを作成し、任意の投与経路、投与方法を選択することができる。たとえば、ジンセノサイドRb₁の水酸基をエステル化してプロドラッグを作成し、脳血液関門を通過せしめたのち、内因性エステラーゼで加水分解して脳内へのジンセノサイドRb₁移行量を増やすことも可能となる。

特願平10—365560号及びPCT/JP99/02550（「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）に記述されたごとく、ジンセノサイドRb₁は静脈内投与で脳梗塞巣を非投与群の1/4程度にまで縮小させ、しかも細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x_L発現増強というユニークな作用機序を有し、脳の神経細胞を保護するものであり、急性期・慢性期の脳梗塞（脳血栓・脳

血栓)のみならず脳出血・クモ膜下出血の急性期や慢性期あるいは一過性脳虚血発作に対しても、神経保護薬として利用することができる。すなわち出血傾向を助長しないジンセノサイドRb₁は脳卒中が疑われる患者に対して救急車の中でも点滴静注が可能な薬物である。また、ジンセノサイドRb₁を血栓溶解療法を実施する前の脳梗塞患者に投与することにより、患者の予後が改善する。

それに加えて本発明のジンセノサイドRb₁は最長28日間の静脈内投与により、脳梗塞病変を1/4程度に縮小するのみならず特に虚血巣周辺部(ischemic penumbra)で破綻・減少した血管網をほぼ正常状態にまで復することができる。従って、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与は脳卒中後に破綻あるいは減少した脳血管網の再生・再構築を促進することにより、同薬剤の静脈内投与終了後もひとたび救済された脳組織が時間を経過しても正常に機能することができると思われる。すなわち、本発明のジンセノサイドRb₁は、Bcl-x_L蛋白の発現増強ならびにアポトーシス様神経細胞死抑止という神経細胞への直接的な保護効果に加えて、脳血管網の再生・再構築というより間接的かつ長期的に起きる防御機構を介して、障害を受けた脳を守ることが期待される。このように、脳梗塞発症後の静脈内投与により、急性期のみならず発症後1ヶ月目においても脳梗塞病変を4分の1程度にまで縮小せしめる化合物としては、ジンセノサイドRb₁が人類史上最初のものであると考えられる。従って、今後ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物をリード化合物として、様々な脳細胞又は神経細胞保護剤が作成できる。

一般臨床の場合では、脳卒中後に新たな発作がないにもかかわらず高次神経機能が持続的に低下し、いわゆる脳卒中後遺症状が悪化の一途をたどる症例があとを絶たない。その理由の1つとして脳卒中発作で破綻・減少した脳血管網の再生や再構築が時として不十分なことがあげられる。このような脳卒中後遺症状の改善のために、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与もしくは点鼻投与が著効を示すことが期待される。

また、本発明のジンセノサイドRb₁静脈内投与は血管の再生・再構築という新規な効果・効能を示す故、血流障害を主症状とする疾病(大動脈炎症候群、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー

症候群等)に効能を示す可能性がある。もちろんこれらの血流障害を主症状とする疾病において、血流障害にさらされた当該組織における細胞死を抑止することもジンセノサイドRb₁の忘れてはならない効能である。従って、末梢組織の血流障害においてもジンセノサイドRb₁は少なくとも2つの作用機構を介して、組織障害を軽減することが期待される。

ジンセノサイドRb₁からなる医薬組成物は一次神経病変とシナプス連絡を有する脳の領域における二次病変を抑止するので、多くの神経変性疾患(アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、舞蹈病、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症等)の二次病変にも効能を示し、これらの疾病による高次神経機能障害の進行を緩らげ患者のQOL(生活の質、Quality of Life)を高めることが期待される。もちろん、特願平10-365560号及びPCT/JP99/02550(「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」)に記述されたごとく、アポトーシス様神経細胞死抑止効果、Bcl-x_L発現増強効果を介して、これら神経変性疾患の一次病変にも効果を発揮することが考えられる。

さらに、本発明のジンセノサイドRb₁静脈内投与は脊髄損傷動物の麻痺を著しく改善する。周知のごとく、神経組織は他の末梢組織に比べて外傷に対して最も脆弱な組織であるので、ジンセノサイドRb₁からなる医薬組成物が脊髄損傷の治療・処置に著効を示すという事実は、ジンセノサイドRb₁が中枢神経組織以外の末梢組織の外傷にも有効であることを物語っている。後述の実施例4に示すごとく、下位胸髄に圧負荷を加えられた脊髄損傷ラットは、損傷後にジンセノサイドRb₁を静脈内投与することにより両下肢麻痺(対麻痺)が改善し立ち上がることが可能となる。生理食塩水(すなわち媒体(vehicle))のみを投与された脊髄損傷ラットは両下肢の麻痺をきたしたままで、まったく立ち上がることができなかった。また、現在脊髄損傷治療薬として用いられているソルメドロール(メチルブレドニゾン)を静脈内投与しても、脊髄損傷ラットの両下肢麻痺(対麻痺)を改善することはできなかった。これらのことから判断すると、ジンセノサイドRb₁の脊髄損傷治療効果は歴史上最強のものと考えられる。従って、今後ジンセ

ノサイド Rb₁もしくはその代謝産物をリード化合物として使用することにより、さらに様々な脊髄損傷ならびに神経外傷・外傷治療薬が開発されるものと期待される。

さらに、本発明のジンセノサイド Rb₁の薬剤としての特徴で、見逃せないのが、これと言った副作用を示さない点である。たとえば特願平 10—365560 号及び PCT/JP99/02550（「ジンセノサイド Rb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）に記述されたごとく、一酸化窒素供与体であるニトロプルシッドナトリウム（SNP）処理をしていない通常の培養神経細胞にジンセノサイド Rb₁を添加しても代謝活性にまったく影響を与えず、SNP 処理をして傷害を受けた神経細胞のみを低濃度（1～100 fg/ml）のジンセノサイド Rb₁が保護するので、ジンセノサイド Rb₁は正常な神経組織の機能にはあまり影響を与えず、病変部にのみ好ましい効果を発揮することができる。この点は神経保護薬として開発途上にあるグルタミン酸受容体拮抗薬よりもはるかに優れた特性といえる。

また、ジンセノサイド Rb₁の脳室内投与により脳温、脳血流、血圧にも影響が及ばないこともすでに報告されている（Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。発明者らはジンセノサイド Rb₁の 60 µg/日の静脈内注入によっても、脳血流に変化が生じないことを確認している。また、ジンセノサイド Rb₁が出血傾向を助長しないことも知られている。もちろん、本発明者らが、今回の各実験例において、本発明のジンセノサイド Rb₁を投与した動物を注意深く観察した範囲内でも、副作用は検出されなかった。

特願平 10—365560 号及び PCT/JP99/02550（「ジンセノサイド Rb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）に記載されたごとく、ジンセノサイド Rb₁は中大脳動脈皮質枝（MCA）永久閉塞ラット（体重約 300 g）において、1 日量 6 µg および 60 µg の静脈内投与で脳梗塞巣を縮小せしめ、場所学習障害（脳血管性痴呆）を改善する。しかも本発明のジンセノサイド Rb

は、同じ投与量でMCA永久閉塞ラットの虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) における脳血管の再生・再構築を促進し、大脳皮質梗塞巣 (一次病変) の縮小に加えて視床の二次病変 (変性) を顕著に抑止する。また、脊髄損傷ラット (下位胸髄損傷ラット) に対しては、1日量 $60 \mu\text{g}$ もしくは $12 \mu\text{g}$ のジンセノサイドRb₁静脈内投与で麻痺の程度が顕著に改善する。

このような実験結果に基づけば、体重 60 kg のヒト脳卒中患者の静脈内への至適薬物投与量は、体重当たりで計算すると1日当たり 1.2 mg から 12 mg ということになる。従って本発明の医薬組成物のヒト脳卒中患者あるいは脊髄損傷患者での1日当たりの投与量としては、患者の個人差や病状にもよるが、 0.1 mg 以上、好ましくは 1 mg 以上、より好ましくは 10 mg 以上である。しかし、一般に動物の体重が増加するにつれて体重当たりの必要薬物投与量が減少することから、ヒトでは、この用量の $1/10$ 以下でも充分効能を示す可能性がある。ジンセノサイドRb₁を脳神経疾患以外の疾病の予防・治療・処置に使用する時は、前述の投与量と同等もしくはその $1/10$ から $1/100$, 000 程度の投与量を選択することが好ましい。本発明の医薬組成物は副作用が少なく、投与量の上限としてはかなり多量にすることもできるが、1日当たり 1 g 以下、好ましくは 0.1 g 以下である。

本発明の医薬組成物の投与方法としては、血管内投与特に静脈内投与が好ましく、前記した投与量を断続的又は連続的に投与することができる。本発明の有効成分であるジンセノサイドRb₁はサボニンの1種であり、通常の方法により製剤化することができる。例えば、本発明の水溶性医薬組成物は、凍結乾燥結晶を生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液等に溶解することにより静脈内投与製剤とすることができる。脂肪乳剤、リポソーム製剤としても使用可能である。静脈内投与するときの製剤の濃度としては余り高濃度でない限り任意の濃度に調整することができ、例えば $0.01 \sim 10 \text{ mg/ml}$ 、好ましくは $0.1 \sim 1 \text{ mg/ml}$ 程度にして投与することができる。

また、本発明における動物実験においては、左中大脳動脈皮質枝 (MCA) 永久閉塞後28日間にわたって、ジンセノサイドRb₁を静脈内へ持続注入したが実際の急性期脳卒中症例では、発症後何の治療も施さなければ2週間以内に虚血巣

周辺部 (ischemic penumbra) における脳血管の破綻・脱落・退縮が急速に進行した結果脳梗塞巣が拡大し、一次病変に続く二次病変も非可逆的な状態になるので、この期間内だけでもジンセノサイド R b₁ を投与すれば、破綻した虚血巣周辺部血管網の再生・再構築ならびに二次病変抑止に役立てることができる。

本発明はジンセノサイド R b₁ の静脈内投与により、破綻・減少した脳血管が再生・再構築することを世界に先がけて報告するものである。脳血管の再生・再構築を促進するということは、ジンセノサイド R b₁ が単に神経組織の血管のみならず末梢組織における血管の再生や再構築にも有効であることを物語っている。すなわち、心筋梗塞、狭心症、大動脈炎症候群、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群等にジンセノサイド R b₁ が効能を示すことが期待される。心筋梗塞を例にとってこのことを少し詳しく説明すると、冠状動脈が永久閉塞して万一再開通されない場合、永久閉塞した冠状動脈でのみ栄養される心筋細胞は壊死に陥る。

しかし、その周辺で他の冠状動脈からの血液供給をわずかながらも受ける心筋細胞は、ジンセノサイド R b₁ の静脈内投与により、まず細胞死抑制遺伝子 B c l - x_L の発現を介して生き残り (特願平 10-365560 号、P C T / J P / 02550、いずれも「ジンセノサイド R b₁ からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」)、その後さらに同部で血管の再生・再構築が起こった結果、永久的に細胞死を免れることになる。すなわち、ジンセノサイド R b₁ は不幸にして冠状動脈のバイパス手術や P T C A (percutaneous transluminal coronary angioplasty) が施されなかった患者に対しても、少なくとも 2 つの異なる作用を介して虚血心筋を保護し、ひいては心筋梗塞巣の縮小に役立つものと期待される。もちろん、心筋梗塞を発症した患者に冠状動脈バイパス手術や P T C A を施す前にジンセノサイド R b₁ を静脈内投与しておけば、患者の予後は著しく改善する。しかも、これら末梢組織の疾患に対しては、神経疾患に使用される用量と同量もしくはその 1 / 10 から 1 / 100, 000 程度の量のジンセノサイド R b₁ で効果・効能が発揮されると思われる。

また、この際忘れてはならないのは、心筋梗塞患者では多くの場合心臓のポン

ブ機能が低下し、脳循環血液量が減少するため、脳に非可逆的な障害が生じる可能性があることである。ジンセノサイドRb₁の静脈内投与は、特願平10—365560号及びPCT/JP99/02550（「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）に記載されたごとく、血流不全にさらされた脳の神経細胞を保護するので、これによりさらに心筋梗塞患者のQOL（生活の質、Quality of Life）改善に役立つ。

次に本発明のジンセノサイドRb₁静脈内投与の作用について詳細に説明する。

まず、本発明者らは、ジンセノサイドRb₁の静脈内注入による作用を検討した。このために、例えば、12～13週齢の雄性SH-SPラット（体重250～300g）を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。吸入麻酔下で同動物の左中大脳動脈皮質枝（MCA）を凝固・切離した。ジンセノサイドRb₁をMCA永久閉塞直後に単回静脈内注入し（6μgまたは60μg）、その後アルザミニ浸透圧ポンプを用いて28日間静脈内へ持続注入（6μg/日または60μg/日）した。

なお、MCAを閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）と、偽手術をした動物には同量の生理食塩水のみを投与した。

MCA永久閉塞後、発明者ら（阪中、田中）の方法に従って（Igase, K. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）2週目と4週目にそれぞれ4日間水迷路テストを実施し、SH-SPラットの場所学習能力を判定した。

その結果を第1図に示す。第1図の左側は2週目の結果であり、同右側は4週目の結果である。また、第1図中の黒丸印は偽手術をしたラットのものであり、白丸印は手術後、生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印はジンセノサイドRb₁を6μg/日投与したものであり、白四角印はジンセノサイドRb₁を60μg/日投与したものである。

第1図のごとくMCA永久閉塞後（脳梗塞後）の場所学習障害が、ジンセノサイドRb₁注入脳梗塞群において生理食塩水注入脳梗塞群に比べて有意に改善された。特に、MCA閉塞後2週目と4週目の水迷路テストで、ジンセノサイドRb

1の低用量では各々3日目と4日目の試行において、ジンセノサイドRb₁の高用量では2週目の4日目および4週目の3日目、4日目に有意な学習能力改善効果を示した。また、4週目の初日にも高用量・低用量とも有意な効果が確認された。なお、SH-SPLラットの泳水速度には各群で有意差はみられなかった。

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-SPLラットを抱水クロラルにて麻酔し、4%バラホルムアルデヒドを含有する0.1Mリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率(%)を算出した。その結果を第2図に示す。

第2図に示されるごとく、ジンセノサイドRb₁静脈内投与脑梗塞群で生理食塩水投与脑梗塞群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。この大脳皮質梗塞比率は梗塞面積をもとに算出したものであるが、その比率の平均値がジンセノサイドRb₁静脈内投与群で生理食塩水投与群の50%程度あるいはそれ以下に低下していることから、実際の脑梗塞体積は、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与により約4分の1程度に縮小したことになる。

第3図Aに生理食塩水投与脑梗塞巣、第3図BにジンセノサイドRb₁(6μg/日)投与脑梗塞巣の実例を示す。

また、第4図に本実験結果をまとめた模式図を示す。生理食塩水投与群では脑梗塞病巣部の大きさが大きいままであり、水迷路テストにおいては目的のプラットフォームに到達するまでに長時間を要しているのに対して、本発明のジンセノサイドRb₁投与群においては病巣部が回復、縮小されており、この結果水迷路テストにおいては目的のプラットフォームに短時間で到達している。

スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いた従来の発明者(阪中)の論文(Wein T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996)では、ジンセノサイドRb₁の腹腔内投与(10mg/kg/日または20mg/kg/日)を虚血負荷前に実施しても、約30%の海馬CA1錐体神経細胞しか救うことができなかった。もちろん、ジンセノサイドRb₁をスナネズミ腹腔内に虚血後に投与してもまったく効果はなかった。しかも、腹腔内投与されたジンセノサイドRb₁の一日量

は、スナネズミの体重（70 g 前後）から判断すると、0.7 mg から 1.4 mg という高用量であるので、ジンセノサイド Rb₁ の投与効率・効能という観点から判断しても、ジンセノサイド Rb₁ の静脈内投与は腹腔内投与よりもはるかに優れた投与方法であり、ヒトへの応用が容易である。周知のごとく、ヒトで薬物を腹腔内に投与する方法はごく一部の例外（腹膜灌流等）を除いてはほとんど実施されていない。

また、本実施例に用いた MCA 永久閉塞動物（脳梗塞ラットもしくは脳塞栓ラット）は明らかに、スナネズミの一過性前脳虚血モデルよりも重篤でありかつヒトの病態に近いモデルである。従って、この MCA 永久閉塞動物において、ジンセノサイド Rb₁ を脳血管閉塞後に静脈内投与して著効を示したということは、ジンセノサイド Rb₁ 少量静脈内注入の有用性、利便性、経済性を明らかにしている。

一方、MCA 永久閉塞動物の脳室内に直接ジンセノサイド Rb₁ を注入してその効果を調べた従来の発明者ら（阪中、田中）の論文では（Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）、MCA 閉塞後に 0.6 μ g / 日の用量でジンセノサイド Rb₁ を脳室内へ持続注入したときのみ有意な脳梗塞抑止効果がみられたが、その結果は本実施例で示したジンセノサイド Rb₁ 静脈内投与の効果と同等ないしそれより少し劣るものであった。また、ジンセノサイド Rb₁ 脳室内投与についての前掲の論文において、その他の用量（6 μ g / 日、0.06 μ g / 日）で MCA 永久閉塞後にジンセノサイド Rb₁ を脳室内へ持続注入してもまったく脳梗塞抑止効果はみられなかったため、ジンセノサイド Rb₁ 脳室内投与の有効濃度域は極めて狭く、実用化は困難と考えられた。しかも、ヒトへの応用を考慮したとき、ジンセノサイド Rb₁ の脳室内注入はその危険性と効能を斟酌した場合、現実的に実施することは不可能と判断される。

一般に、神経保護因子は脳室内あるいは脳実質内に直接投与した場合にもっとも大きな効果を発揮し、静脈内投与や腹腔内投与をした場合には、脳血液関門に遮断されたり、代謝分解を受けてその効果・効能が激減あるいは消失すると考えられる。従って、ジンセノサイド Rb₁ に関して、その腹腔内投与や脳室内投与実験結果から判断して、静脈内投与の効果・効能はまったく予想されていなかった。

しかし、本実験例で明らかにされたごとく、ジンセノサイド Rb₁ の静脈内投与は脳室内投与の場合よりも広い濃度域で MCA 永久閉塞ラットの脳梗塞巣をより効果的に縮小せしめ、同動物の学習能力を改善することが発明された。また、ジンセノサイド Rb₁ は薬用人参中に含有される精製サポニンであるが、経口投与により血中ではまったく検出されないため事実上ジンセノサイド Rb₁ 自体の薬理作用は否定されてきた（小橋ら、薬用人参'95、pp213-221、熊谷 朗編、共立出版株式会社）。従って、本実施例により特願平 10—365560 号及び PCT/JP99/02550（「ジンセノサイド Rb₁ からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）に記述されたごとく、静脈内投与されたジンセノサイド Rb₁ が薬用人参とは独立した効果・効能・用途をもつことが明らかにされた。

次に発明者らは、ブレグマ（bregma）後方 2.8 mm 前後のレベルの脳から 5 μ m 厚のパラフィン切片を作成し、ジンセノサイド Rb₁ 静脈内投与群の頭頂葉梗塞巣周辺部（すなわちジンセノサイド Rb₁ 投与により救済された脳組織）（第 5 図）における 1.27 mm²あたりの血管面積を大脳半球ごとに 4 枚の微分干涉顕微鏡写真を用いて測定し（第 6 図）、血管面積率を算出した（表 1）。

表 1

	健常側 (%)	虚血側 (%)
Rb ₁ : 6 μ g / 日	7.0 \pm 0.64	8.0 \pm 0.58
Rb ₁ : 60 μ g / 日	8.3 \pm 0.92	9.0 \pm 0.52

また、対照側（健常側）でも同様の血管面積率を測定した。表 1 はジンセノサイド Rb₁ 6 μ g / 日および 60 μ g / 日投与群の脳血管面積率を健常側と虚血側で比較する表である。データは平均値 \pm 標準誤差で示されており、統計解析法は ANOVA + Fisher の PLSD によっている。表 1 に示したごとく、血管面積率は対照側、虚血側で有意差はみられなかった。このことは MCA 永久閉

塞後28日以内のジンセノサイドRb₁静脈内注入により、虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) の大脳皮質血管網がほぼ再生・再構築されたことを物語っている。ちなみに、MCA永久閉塞直後の頭頂葉梗塞巣周辺部は当然のことながら健常側に比べて血管面積率が著しく低下する。

また、ブレグマ (bregma) 後方3.6mmのレベルのバラフィン切片にニッスル染色を施し、同レベルにおける左右視床の面積比 (虚血側/健側×100) を測定したところ、ジンセノサイドRb₁投与群でvehicle (生理食塩水) 投与虚血群に比して有意に高くなっており、ほぼ偽手術群と近似した値になっていた。このことは大脳皮質梗塞後に生じる視床の二次性萎縮が、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与によりほぼ完全に抑止されたことを示している。さらに、発明者らは大脳皮質の虚血中心部 (ischemic core) と密接なシナプス連絡 (線維連絡) を有する視床腹側後側核 (視床VP核) の組織像を調べた。第7図Aは偽手術動物の視床VP核を、第7図Bは生理食塩水投与虚血動物の視床VP核を、第7図CはジンセノサイドRb₁ (60 μg/日) 投与虚血動物の視床VP核を、それぞれ示す。vehicle (生理食塩水) 注入虚血群 (第7図B) に比べて、ジンセノサイドRb₁ 静脈内投与虚血群 (第7図C) で、有意に神経細胞が二次変性を免れて多数残存していた。従って、ジンセノサイドRb₁は静脈内投与により、視床二次変性を抑止することが判明した。

次に発明者らは、神経組織の二次変性をきたす難治性疾患として脊髄損傷を取りあげ、ジンセノサイドRb₁静脈内投与の効果を調べた。脊髄のある分節たとえば下位胸髄に圧負荷が加わると、同部の灰白質神経細胞のみならず同部の白質伝導路が障害を受ける。白質伝導路の障害はさらに遠位部 (尾側) へと進展し、かつ伝導路の起始細胞すなわち伝導路に線維を投射している上位の神経細胞体 (すなわち起始細胞) の二次変性をもたらす。このようにして、圧負荷を受けた下位胸髄の白質伝導路の障害は、伝導路の起始細胞体 (神経細胞体) ならびに下位胸髄以下 (すなわち腰髄、仙髄) の伝導路の二次変性を惹起することにより、両下肢の対麻痺を引き起こす。また、下位胸髄の損傷により、腰髄・仙髄に対する上位の脳からの神経支配が途絶えるため、さらに腰髄・仙髄の灰白質でも神経細胞

の二次変性が進行し、両下肢の対麻痺が回復不能となるものと思われる。発明者らは、このような脊髄損傷のモデルとして、下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷されたウイスターラット（体重約300 g）を用いた。

ハロセン、笑気による吸入麻酔下で、ラットの下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷した後、30分以上経過してから左大腿静脈にジンセノサイドRb₁（12 μ gまたは60 μ g）を単回注入し、さらに同静脈へジンセノサイドRb₁（12 μ g／日または60 μ g／日）をアルザミニ浸透圧ポンプにて7日間持続投与した。対照動物ならびに偽手術動物には同様のスケジュールで同量の生理食塩水（vehicle、媒体）を投与した。脊髄損傷前、脊髄損傷当日、脊髄損傷後1日目から7日目まで、各ラットのOpen field locomotor scores（Basso, Bettie and Bresnakan（BBB）scores）を計測して運動能力の指標とした（Basso D.M. et al., J. Neurotrauma, 13, 343-359, 1996）。ちなみに偽手術ラット（正常ラット）のBBB scores（BBBスコア）は20ないし21である。

第8図Aは脊髄損傷後2日目の生理食塩水投与ラットを、第8図Bは脊髄損傷後2日目のジンセノサイドRb₁（60 μ g／日）投与ラットを、それぞれ示している。第8図Aに示すごとく、下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷された生理食塩水投与ラットは明らかに両下肢の対麻痺を呈する。しかし下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷したのちにジンセノサイドRb₁（60 μ g／日）を静脈内投与すると、第8図Bに示すごとく2日後には、両下肢の対麻痺が著しく改善し、ラットは物につかまりながら立ち上がることができるようになる。

脊髄損傷後7日目のBBBスコア（scores）にてラットの運動能力を定量化したグラフのみを第9図に示す。第9図に示すごとく、脊髄損傷ラットの運動能力はジンセノサイドRb₁静脈内投与の用量に依存して有意に改善した。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによっている。

なお、脊髄損傷治療薬として現在臨床現場で使用されているソルメドロール（メチルプレドニゾロン）を30 mg／kgの用量で発明者らが作成した脊髄損傷ラットの大腿静脈にジンセノサイドRb₁を投与する場合と同様のスケジュールで静脈内投与しても有意な麻痺改善効果はみられなかった。また、ソルメドロー

ル投与ラットでは、背部の手術創の治癒が生理食塩水投与ラットに比べて明らかに遅延したが、ジンセノサイドR b₁投与ラットではそのような副作用は認められなかった。このことは、ジンセノサイドR b₁が脊髄損傷・神経外傷治療薬としてはソルメドロールよりも優れた特性を有していることを物語っている。しかも、ジンセノサイドR b₁の投与量はソルメドロールの投与量よりもはるかに少なく、さらにジンセノサイドR b₁はソルメドロールのような免疫機能抑制作用や消化性潰瘍誘発作用を有していないので、極めて安全な脊髄損傷・神経外傷治療薬となることが期待される。

脊髄損傷ラットを用いた本実験結果より、ジンセノサイドR b₁からなる静脈内投与製剤の脊髄損傷治療効果は歴史上最強のものと考えられる。おそらくジンセノサイドR b₁もしくはその代謝産物が極めて強力な脊髄損傷治療作用を発揮するものと思われるが、このことはジンセノサイドR b₁もしくはその代謝産物が脊髄損傷・神経外傷治療のためのリード化合物になり得ることも支持している。本実験結果は、さらにジンセノサイドR b₁が脊髄損傷後の神経組織二次変性をも抑止することを支持している。

また、周知のごとく神経組織は他の末梢組織に比べて外傷に対して最も脆弱な組織であるので、ジンセノサイドR b₁からなる医薬組成物が脊髄損傷の治療・処置に著効を示すという事実は、ジンセノサイドR b₁が中枢神経組織以外の組織すなわち末梢組織の外傷にも有効であることを物語っている。

このようにジンセノサイドR b₁の脊髄損傷・神経外傷治療効果は画期的なものであるので、ジンセノサイドR b₁もしくはその代謝産物をリード化合物として新規脊髄損傷・神経外傷治療薬を合成できるのみならず、ジンセノサイドR b₁もしくはその代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脊髄損傷・神経外傷・外傷治療薬の開発を目指すことができる。

また、脊髄損傷においては、グリア細胞のうちでも特にオリゴデンドロサイトが傷害を受けてアポトーシスに陥った結果、脱髄現象が起こり神経症状が悪化・進行すると報告されている (Crowe, M. J. et al., Nature Med. 3, 73-76, 1997; Emery, E. et al., J. Neurosurg. 89, 911-920, 1998)。ジンセノサイドR

b₁の静脈内投与が顕著に脊髄損傷ラットの両下肢麻痺を改善するという実験結果は、ジンセノサイドR b₁がオリゴデンドロサイトのアポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を抑止することにより、脊髄損傷の症状を改善することを物語っている。従って、本発明のジンセノサイドR b₁はオリゴデンドロサイトを保護することにより、脱髄をきたす脳神経疾患（多発性硬化症、ヒンスワンガー病等）の予防・治療・処置にも有効であると考えられる。さらに、ジンセノサイドR b₁の静脈内投与が脊髄損傷ラットの両下肢麻痺（対麻痺）を改善するという実験結果は、損傷を受けた神経線維もしくは神経組織がジンセノサイドR b₁投与により再生することも示唆している。

以上の実験結果から、ジンセノサイドR b₁又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤が脳卒中病変で破綻あるいは減少した脳血管網を再生・再構築せしめ、その脳細胞（グリア細胞を含む）保護作用又は神経細胞保護作用（特願平10-365560号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイドR b₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」とあいまって、脳組織を保護することが明らかになった。また、ジンセノサイドR b₁又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤が神経組織の一次病変のみならず、一次病変とシナプス連絡（線維連絡）を有する脳領域の二次病変をも抑止することが明らかにされた。さらに、ジンセノサイドR b₁からなる医薬組成物は脊髄損傷・神経外傷の画期的治療薬となるのみならず末梢組織の外傷にも効果・効能を示すことが期待される。

本発明で使用されるジンセノサイドR b₁又はその塩は、薬用人参の成分として知られており、副作用の極めて少ない物質である。

実施例

次に、具体的な試験例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

実施例1（ジンセノサイドR b₁静脈内注入実験）

12～13週齢の雄性SH-S Pラット（脳卒中易発症高血圧自然発症ラット、体重250～300g）を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で

飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。同動物の血圧は 203.1 ± 6.9 mmHg であり、以下の実験は愛媛大学医学部附属動物実験施設の動物実験指針に則ってなされた。吸入麻酔下で直腸温を 37 ± 0.2 °C に維持した SH-S P ラットの左中大脳動脈皮質枝 (MCA) を凝固・切離した。

MCA 永久閉塞の直後に左大腿静脈からジンセノサイド Rb₁ の生理食塩水溶解液 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ または $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) を $60 \mu\text{l}$ (ジンセノサイド Rb₁ として $60 \mu\text{g}$ または $6 \mu\text{g}$) 単回注入した。その後、背部皮下に埋めたアルザミニ浸透圧ポンプと連結するカテーテルを、ジンセノサイド Rb₁ 単回注入部位から左大腿静脈に挿入・留置した。あらかじめ、同ミニ浸透圧ポンプには、ジンセノサイド Rb₁ の生理食塩水溶解液を満たしておき、ジンセノサイド Rb₁ $60 \mu\text{g}/\text{日}$ または $6 \mu\text{g}/\text{日}$ の用量で左大腿静脈から 28 日間持続注入した。なお、ジンセノサイド Rb₁ 溶解液の流量は $0.25 \mu\text{l}/\text{時}$ であった。MCA を永久閉塞した対照動物 (虚血コントロール動物) と偽手術動物には同量の生理食塩水のみを投与した。

実施例 2 (水迷路テスト)

MCA 永久閉塞後、発明者ら (阪中、田中) の方法に従って (Igase, K. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998) 2 週目と 4 週目にそれぞれ 4 日間水迷路テストを実施し、SH-S P ラットの場合学習能力を判定した。

その結果を第 1 図に示す。第 1 図の左側は 2 週目の結果であり、同右側は 4 週目の結果である。また、第 1 図中の黒丸印 (●) は偽手術をしたラットのものであり、白丸印 (○) は手術後、生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印 (■) はジンセノサイド Rb₁ を $6 \mu\text{g}/\text{日}$ 投与したものであり、白四角印 (□) はジンセノサイド Rb₁ を $60 \mu\text{g}/\text{日}$ 投与したものである。データは平均値 ± 標準誤差で示されており、統計解析法は ANOVA + Fisher の PLSD によっている。

なお、SH-S P ラットの水泳速度には各群で有意差はみられなかった。

実施例 3（病巣部比率測定）

4 週目の水迷路テスト終了後に、SH-SP ラットを抱水クロラルにて麻酔し、4 % パラホルムアルデヒドを含有する 0.1 M リン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率 (%) を算出した。その結果を第 2 図に示す。データは平均値 ± 標準誤差で示されており、統計解析法は Mann-Whitney U テストによっている。

第 3 図 A に生理食塩水投与脑梗塞巣、第 3 図 B にジンセノサイド Rb₁ (6 μ g / 日) 投与脑梗塞巣の実例を示す。

また、第 4 図に本実験結果をまとめた模式図を示す。生理食塩水投与群では脑梗塞病巣部の大きさが大きいままであり、水迷路テストにおいて目的のプラットホームに到着するまでに長時間を要しているのに対して、本発明のジンセノサイド Rb₁ 投与群においては病巣部が回復、縮小されており、この結果水迷路テストにおいては目的のプラットホームに短時間で到着している。

次に摘出脳をパラフィンに包埋し、ブレグマ (Bregma) 後方 2.8 mm 前後のレベルで大脳皮質梗塞巣を含む 5 μ m 厚のパラフィン切片を作成した。ジンセノサイド Rb₁ 静脈内投与群の頭頂葉梗塞巣周辺部、すなわちジンセノサイド Rb₁ 投与により救済された虚血巣周辺部の脳組織 (第 5 図) における 1.27 mm² あたりの血管面積を大脳半球ごとに 4 枚の微分干渉顕微鏡写真を用いて測定し (第 6 図)、血管面積率を算出した (表 1)。また、健常側 (対照側) でも同様の血管面積率を測定した。表 1 に示したごとく、血管面積率は健常側・虚血側で有意差はみられなかった。

第 5 図は、5 μ m 厚脳切片に占める頭頂葉梗塞巣周辺部血管の血管面積測定部位を示したものであり、第 5 図の長方形で囲った部分は血管面積測定域：頭頂葉大脳皮質第 II ~ 第 VI 層であり、第 5 図の黒く塗りつぶした部分はジンセノサイド Rb₁ 投与時の梗塞巣であり、第 5 図の灰白で表示した部分は生理食塩水投与時の梗塞巣である。

第 6 図は、梗塞巣周辺の大脳皮質および健常側同部位大脳皮質血管網を示した

図面に代わる写真である。上側は健常側を示しており、下側は虚血側を示している。

表 1 は、 $5\mu\text{m}$ 厚脳切片に占める頭頂葉梗塞巣周辺部血管の面積率を示し、データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はANOVA+ FisherのPLSDによっている。Nは5である。

また、ブレグマ (Bregma) 後方 3.6mm のレベルのパラフィン切片にニッスル染色を施し、同レベルにおける左右視床の面積比 (虚血側/健常側 $\times 100$) を測定したところ、ジンセノサイドRb₁投与虚血群でvehicle (生理食塩水) 投与虚血群に比して、有意に高くなっておりほぼ偽手術群と近似した値になっていた。結果を表 2 に示す。

表 2

	n	面積比 (%)	神経細胞数
生理食塩水	8	86.4 ± 8.1	10.1 ± 5.5
Rb ₁ : $6\mu\text{g}/\text{日}$	5	$95.9 \pm 3.3^*$	$30.6 \pm 2.9^{**}$
Rb ₁ : $60\mu\text{g}/\text{日}$	8	$95.3 \pm 2.4^*$	$31.5 \pm 3.6^{**}$
偽手術群	8	98.8 ± 5.3	58.5 ± 4.7

表 2 は、視床左右面積比と視床腹側後側核 0.099mm^2 あたりの神経細胞数を示し、データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによっている。表 2 中の*は $P < 0.05$ であることを示し、**は $P < 0.01$ であることを示す。さらに、虚血中心部 (ischemic core) と密接なシナプス連絡 (線維連絡) を有する視床腹側後側核 (視床VP核) においても、vehicle (生理食塩水) 注入虚血群に比べて、ジンセノサイドRb₁静脈内投与虚血群で、有意に神経細胞が二次変性を免れて多数生存していた。

実施例 4 (脊髄損傷ラットに対するジンセノサイドRb₁静脈内投与の効果)

ハロセン、笑気による吸入麻酔下で、ラットの下位胸髄に 20g の圧力を 20

分間負荷した後、30分以上経過してから左大腿静脈にジンセノサイドRb₁ (12 μ g または 60 μ g) を単回注入し、さらに同静脈へジンセノサイドRb₁ (12 μ g/日 または 60 μ g/日) をアルザミニ浸透圧ポンプにて7日間持続投与した。対照動物ならびに偽手術動物には同様のスケジュールで同量の生理食塩水 (媒体 (vehicle)) を投与した。脊髄損傷前、脊髄損傷当日、脊髄損傷後1日目から7日目まで、各ラットのオープン・フィールド・ロコモーター・スコアズ (Open field locomotor scores: Basso, Beattie and Bresnakan (BBB) scores) を計測して運動能力の指標とした (Basso D.M. et al., J. Neurotrauma, 13, 343-359, 1996)。

第8図Aは脊髄損傷後2日目の生理食塩水投与ラットを、第8図Bは脊髄損傷後2日目のジンセノサイドRb₁ (60 μ g/日) 投与ラットを、それぞれ示している。第8図Aに示すごとく、下位胸髄に20gの圧力を20分間負荷された生理食塩水投与ラットは明らかに両下肢の対麻痺を呈する。しかし下位胸髄に20gの圧力を20分間負荷したのちにジンセノサイドRb₁ (60 μ g/日) を静脈内投与すると、第8図Bに示すごとく2日後には、両下肢の対麻痺が著しく改善し、ラットは物につかまりながら立ち上がることができるようになる。

脊髄損傷後7日目のBBBスコア (scores) にてラットの運動能力を定量化したグラフのみを第9図に示す。第9図に示すごとく、脊髄損傷ラットの運動能力はジンセノサイドRb₁ 静脈内投与の用量に依存して有意に改善する。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによっている。*は $P < 0.01$ を**は $P < 0.005$ を示す。

実施例5 (ジンセノサイドRb₁による褥創の予防・治療・処置)

寝たきり患者ならびに高齢者の褥創は、全身状態を悪化させるきっかけともなりQOL (生活の質、Quality of Life) を著しく損なう皮膚疾患である。褥創の早期には病変部皮膚の発赤がみられるが、この時点で病変部局所ならびにその周辺に塗布して効果・効能を示す外用剤がほとんどないことが、皮膚科領域で大きな問題となっている。

ブドウ糖を含有するか含有しない水溶性基剤あるいは脂溶性基剤にジンセノサ

イドRb₁を混入して皮膚外用剤（クリームまたは軟膏）を作成し、褥創部局所およびその周辺部に褥創病変が治癒するか縮小するかあるいは悪化しなくなるまで、常時塗布する。その際に局部におけるジンセノサイドRb₁の細胞外液濃度が1 ng/ml以下、好ましくは10 pg/ml以下、より好ましくは100 fg/ml以下となるように基剤へのジンセノサイドRb₁混入量を調整する。また、ジンセノサイドRb₁を含有する皮膚外用剤の局所塗布で十分な効果が得られなければ、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与を併用する。

実施例6（ジンセノサイドRb₁による角膜損傷の予防・治療・処置）

コンタクトレンズ装着あるいはエキシマレーザーによる近視矯正術後に角膜損傷が生じることがよく知られているが、実際に角膜組織を保護する点眼薬はほとんどないのが現状である。

各種点眼用基液にジンセノサイドRb₁を混入して点眼薬を作成し、角膜損傷患者に連日必要回数点眼し、角膜病変が改善するまであるいは治癒するまで点眼を継続する。その際に角膜病変組織におけるジンセノサイドRb₁の細胞外液濃度が1 ng/ml以下、好ましくは10 pg/ml以下、より好ましくは100 fg/ml以下となるように基液へのジンセノサイドRb₁混入量を調整する。

実施例7（ジンセノサイドRb₁による移植用角膜の保護）

角膜移植は、移植医療の中でも最も成功率の高い治療法として眼科領域では頻繁に実施されている。しかし、遺体から角膜を採取したのち移植手術を実施するまでの間にも移植用角膜組織を構成する細胞は確実に死に至り始めるため、このことが角膜採取から移植手術までの時間を制約する最大の要因となっている。

移植用角膜を採取後、従来の角膜保存液の中にジンセノサイドRb₁を1 ng/ml以下、好ましくは10 pg/ml以下さらに好ましくは100 fg/ml以下となるように混入して移植用角膜を保護することができる。

実施例8（ジンセノサイドRb₁による舞蹈病の予防・治療・処置）

舞蹈病（ハンチントン病）は神経変性疾患の中でも代表的な単一遺伝子病とし

て知られており、ポリグルタミンをコードする C A G のくり返し配列が病因であると考えられているが、その治療法はいまだ開発されていない。舞踏病の責任遺伝子であるミュータントハンチンチン (mutant huntingtin) を線条体由来の培養神経細胞に導入 (transfection) すると、同細胞はアポトーシス様神経細胞死に陥る。しかし、ミュータントハンチンチン (mutant huntingtin) とともに B c l - x_L を培養神経細胞に強制発現しておくこと、同細胞の死がほぼ完全に抑止されることが報告されている (Saudou, F., et al., Cell, 95, 55-66, 1998)。従って特願平 10-365560 号及び P C T / J P 99 / 02550 (「ジンセノサイド R b₁ からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」) で発明者らが見出したごとく、脳神経組織における B c l - x_L 蛋白発現増強作用を有するジンセノサイド R b₁ を、舞踏病発病前あるいは発病後に点鼻もしくは静脈内投与すれば、効果・効能を示す可能性が高い。また舞踏病以外のポリグルタミン病 (Machado-Joseph 病、dentatorubral-pallidoluysian atrophy 等) でもジンセノサイド R b₁ の点鼻もしくは静脈内投与が有効と思われる。さらに、本発明で見出されたごとく、ジンセノサイド R b₁ は舞踏病の一次病変 (線条体病変) から、線条体と線維連絡を有する他の脳領域へ二次変性が進展することも阻止すると期待される。

遺伝子診断によって舞踏病あるいはその他のポリグルタミン病を将来発症することが判明したヒト (体重 60 kg と仮定)、あるいはすでに舞踏病もしくはその他のポリグルタミン病を発症した患者 (体重 60 kg と仮定) に、ジンセノサイド R b₁ を適量病状が改善するかあるいは安定するまで点鼻もしくは静脈内投与する。また、ポリグルタミン病治療のためのジンセノサイド R b₁ 静脈内投与量は急性期脳卒中治療に要する投与量と同様である。点鼻投与については、静脈内投与されたジンセノサイド R b₁ と同様の血中濃度が維持できるように、点鼻投与量を調整すればよい。

実施例 9 (ジンセノサイド R b₁ による拡張型心筋症の予防・治療・処置)

拡張型心筋症は原因の不明な心筋細胞死 (心筋細胞変性) の結果、心機能の低下と心拡大を呈する疾患である。心機能低下は進行性に増悪し、心不全症状を発症し、死に至る。心不全が悪化したときには、心移植以外に治療法はないと考え

られてきた。おそらく、拡張型心筋症患者の心筋細胞が死に至るときには、心筋細胞に豊富に含まれる細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL 蛋白が減少するものと推測されるので、この Bcl-xL 蛋白の減少をジンセノサイド Rb₁ の静脈内投与もしくは点鼻投与によりくい止めることにより（特願平 10-365560 号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイド Rb₁ からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）、同患者の心筋細胞死を抑止することができ、ひいては同患者の心機能を長期にわたって維持することが可能になると思われる。

拡張型心筋症と診断された患者（体重 60 kg と仮定）に対して、速やかにジンセノサイド Rb₁ を適当量病状が改善するかあるいは病状の進行が止まるまで点鼻もしくは静脈内投与する。また、ジンセノサイド Rb₁ の投与と、 β -ブロッカー、カルシウム拮抗剤、ACE 阻害剤、利尿剤等の心筋症・心不全治療薬の内服とを併用することも可能である。心疾患を始めとする末梢臓器の疾病に対して、ジンセノサイド Rb₁ を投与するときは、中枢神経疾患に対する投与量と同等もしくはその 1/10 から 1/100, 000 程度の投与量を選択することが好ましい。

産業上の利用可能性

本発明は、低濃度のジンセノサイド Rb₁ の静脈内投与用製剤からなる極めて有効な、脳卒中（脳出血、クモ膜下出血、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、一過性脳虚血発作を含む）後の脳血管再生・再構築促進剤を提供する。すなわち、ジンセノサイド Rb₁ に関する本発明は、脳卒中が疑われる患者に対して救急車の中でも点滴静注が可能な薬物を提供するものである。実際の急性期脳卒中症例では、発症後 2 週間以内に病変が進行することが多いので、この期間内だけでも本発明のジンセノサイド Rb₁ を投与すれば充分効果が期待できる。

さらに、本発明の医薬組成物は、血管の再生・再構築という新規な効果・効能を示す故、血流障害を主症状とする疾病（大動脈炎症候群、膠原病、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、血栓性静脈炎、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、網膜中心動静脈閉塞症、レイノー病、レイノー症候群、心筋梗塞、褥創、末梢循環不全、狭心症、肝・腎・心虚血再灌流障害等）に効能を示

す。もちろん、特願平10-365560号ならびにPCT/JP99/02550（「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）に記載されたごとくこれらの血流障害を主症状とする疾病において、血流障害にさらされた当該組織における細胞死を抑制することもジンセノサイドRb₁の忘れてはならない効能である。従って、中枢末梢を問わず血流障害を主要症状とする疾病において、ジンセノサイドRb₁は少なくとも2つの作用機構を介して、血流障害にさらされた組織・細胞の障害を軽減する。

一般に神経疾患の一次病変が生じる原因は多種多様であることはよく知られている。たとえば、脳卒中は脳血管の破綻・閉塞・血流不全が原因であるが、神経変性疾患は遺伝子異常・環境要因・生活習慣等が複雑に絡み合った結果発症するので、個々の神経変性疾患について発病の原因をつきとめた上で、その原因を排除し、一次病変の進行をくい止めるのは必ずしも容易ではない。一方、脳卒中にしろ神経変性疾患にしろ、一次病変の原因は異なろうとも、ひとたび一次病変が形成されると、一次病変部位とシナプス連絡（線維連絡）を有するさまざまな脳領域が二次変性を起こすと言われている。おそらく、このようなシナプス連絡（線維連絡）に帰因する神経組織の二次変性には、少なくとも一部共通のメカニズムが関与することが想定される。本発明では低濃度のジンセノサイドRb₁の静脈内投与が脳皮質梗塞後に生じる視床の二次変性ならびに脊髄損傷後の神経組織二次変性を効果的に抑止したので、これらのことから判断すると、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与もしくは点鼻投与は他の型の脳卒中一次病変（脳出血、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作）ならびにその他の脳神経疾患の一次病変（アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、脱髄疾患、舞蹈病、ポリグルタミン病、脳性マヒ、筋萎縮性側索硬化症、緑内障、老人性黄斑変性症、エイズ脳症、肝性脳症、脳炎、進行性核上性麻痺、多発性硬化症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経症、網膜剥離、網膜色素変性症、一酸化炭素中毒、新生児仮死、末梢神経障害、痙攣性対麻痺、進行性核上性麻痺、脊髄血管障害、ミトコンドリア脳筋症、髄膜炎等）に続発する神経組織の二次変性の抑止などにも有効とされる。また、脊椎（腰椎）椎間板ヘルニア、脊柱管狭窄症、脊椎分離、すべり症、頸椎症、後縦靱帯骨化症に伴う脊髄や神経根の圧迫・麻痺ならびに顔面神経麻痺に対

してもジンセノサイドRb₁投与が有効である。ジンセノサイドRb₁のこれらの効果効能は神経難病に苦しむ患者の病状進行を遅らせ、QOL（生活の質、Quality of Life）を改善するのに役立つものと思われる。

ジンセノサイドRb₁は肝炎や腎炎においても急性期及び慢性期に肝細胞や腎細胞を保護することが期待されるが、それに加えて肝炎や腎炎により破綻した同臓器の血管網を再生・再構築せしめることにより、肝炎及び腎炎患者の予後を改善するものと思われる。さらにジンセノサイドRb₁は、その細胞保護作用と血管再生・再構築促進作用を介して、褥創や創傷治癒に効果・効能を発揮する。この場合ジンセノサイドRb₁は、静脈内投与剤としてのみならず外用剤や病変部局所注射剤としても使用可能である。さらに、ジンセノサイドRb₁の投与方法として、皮下注射、筋肉注射、点眼、点鼻、吸入、挿肛投与、経口投与、舌下投与、経皮投与等任意の経路が選択できる。ただし、ジンセノサイドRb₁を経口投与剤として使用する時は、ジンセノサイド単独投与では効果があまり期待できないので、消化管での分解を阻止する担体あるいは消化管での吸収を促進する担体にジンセノサイドRb₁を混入・封入又は結合させたのちに、経口投与することが必要になる。また、ジンセノサイドRb₁の代謝産物のうちジンセノサイドRb₁と同等もしくはそれ以上の効果・効能を有するものが同定されれば、ジンセノサイドRb₁の適応が期待される前述の疾病に対して、その活性代謝産物を既述の方法で投与することもできる。また本発明のジンセノサイドRb₁と高分子化合物との分散体を作成した後、噴霧乾燥させて任意の投与経路を選択することも可能である。さらに、高分子化合物のマイクロ粒子にジンセノサイドRb₁をコーティングしたのちに、任意の投与経路を選択してもよい。

また、皮膚移植用ケラチノサイト培養シートの保護・維持にもジンセノサイドRb₁が有効と思われる。その他の移植用臓器（肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺、消化管、角膜、血管等）についても、移植手術が実施されるまでの間に低濃度のジンセノサイドRb₁で浸すか灌流することにより（特願平10—365560号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）、同臓器の細胞傷害や血管網の破綻が抑止され移植手術の成績も向上するものと期待される。さらに、ジンセノサイドRb₁は輸血用血球

成分・血小板の保護・維持、凍結卵子あるいは精子の保護・維持にも有効と思われる。

本発明のジンセノサイドRb₁静脈内投与は脊髄損傷動物の対麻痺を著しく改善する。周知のごとく、中枢神経組織は他の末梢組織に比べて外傷に対して最も脆弱な組織であるので、ジンセノサイドRb₁からなる医薬組成物が脊髄損傷の治療・予防・処置に著効を示すという事実は、ジンセノサイドRb₁が中枢神経組織以外の末梢組織の外傷にも有効であることを物語っている。実施例4に示すごとく、下位胸髄に圧負荷を加えられた脊髄損傷ラットは、損傷後にジンセノサイドRb₁を静脈内投与することにより立ち上がることが可能となる。生理食塩水（すなわち媒体（vehicle））のみを投与された脊髄損傷ラットはまったく立ち上がることができず、下肢の麻痺をきたすので、これらのことから判断すると、ジンセノサイドRb₁の脊髄損傷治療効果は歴史上最強のものと考えられる。従って、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物をリード化合物として使用することにより、今後、さらに様々な脊髄損傷・神経外傷・外傷治療薬が新規に開発されるものと期待される。また、ジンセノサイドRb₁の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物の合成も可能となる。このように、本発明は、有史以来人類を脅かしてきた脊髄損傷・神経外傷に対する治療薬を開発する上で必須のものとなる。

ひとたび脳の主要血管たとえばMCAが永久閉塞すると、当初強力な神経細胞保護剤で虚血巣周辺部（ischemic penumbra）の神経細胞が救済されても、脳血管の再生・再構築が達成されなければやがて虚血巣周辺部のいったん救済された神経細胞も死に至る可能性が高く、その結果、MCA永久閉塞後1ヶ月もすれば脳梗塞病巣が大きく拡大することがしばしば起こる。このような経時的脳梗塞病巣拡大は、臨床的にもよくみられることであり、脳梗塞患者の予後が悪いという病理組織学的根拠ともなっている。残念ながら、MCA永久閉塞後に静脈内投与することにより急性期のみならず脳梗塞発症後1ヶ月目においても病巣体積を非投与群の4分の1程度に縮小せしめる薬物はこれまで見出されていなかった。本発明ではジンセノサイドRb₁の脳梗塞発症後静脈内投与が、MCA永久閉塞後1ヶ月目において病巣を非投与群の4分の1程度に縮小せしめたので、このことから

判断すると、ジンセノサイド Rb₁ は人類史上最も効果的な神経細胞保護剤と言える。従って、今後ジンセノサイド Rb₁ もしくはその代謝産物をリード化合物として使用することにより、様々な神経細胞又は脳細胞保護剤を新規に作成することが可能となる。また、ジンセノサイド Rb₁ の化学構造の一部を修飾することによりプロドラッグを作成し、既述のごとく任意の投与経路、投与方法を選択することができる。最後に、本発明の医薬組成物は副作用がほとんど無く、安定性の高い薬物を提供するものである。

請 求 の 範 囲

1. ジンセノサイド Rb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用医薬組成物。
2. 神経組織の損傷による神経組織の二次変性を抑制することからなる請求の範囲第1項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
3. 二次変性をきたす神経組織が脳皮質梗塞後の視床である請求の範囲第2項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
4. 神経組織の二次変性をきたす疾患が脊髄損傷である請求の範囲第2項又は第3項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
5. 損傷を受けた神経組織又は脊髄組織の血管の再生又は再構築によるものである請求の範囲第1項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
6. 血管が脳の血管である請求の範囲第5項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
7. 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、外傷によるものである請求の範囲第1項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
8. 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、脱髄である請求の範囲第1項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
9. 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、脊髄損傷である請求の範囲第1項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
10. オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑制させることによるものである請求の範囲第8項又は第9項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
11. 静脈内投与用製剤である請求の範囲第1項～第10項のいずれかに記載の医薬組成物。
12. 単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第1項～第10項のいずれかに記載の静脈内投与用製剤。
13. ジンセノサイド Rb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる血管の再生又は再構築を促進させるための医薬組成物。

14. ジンセノサイド Rb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織の二次変性の予防、処置又は治療用医薬組成物。

15. ジンセノサイド Rb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の外傷の悪化予防、処置又は治療用医薬組成物。

16. 外傷が、脊髄損傷、神経外傷もしくは頭部外傷である請求の範囲第15項に記載の医薬組成物。

17. ジンセノサイド Rb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止させるための医薬組成物。

18. オリゴデンドロサイトのアポトーシスまたはアポトーシス様細胞死をきたす疾患が脊髄損傷である請求の範囲第17項に記載の医薬組成物。

19. ジンセノサイド Rb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる脱髄の予防、処置又は治療用医薬組成物。

20. 脱髄をきたす疾患が脊髄損傷である請求の範囲第19項に記載の医薬組成物。

21. ジンセノサイド Rb₁又はその代謝産物をリード化合物として、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索する方法。

22. 神経組織又は脊髄組織の疾患が、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患である請求の範囲第21項に記載の方法。

23. 神経組織又は脊髄組織の疾患が、脊髄損傷又は神経外傷である請求の範囲第21項又は第22項に記載の方法。

24. 請求の範囲第21項～第23項のいずれかに記載の方法により得られた神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療剤。

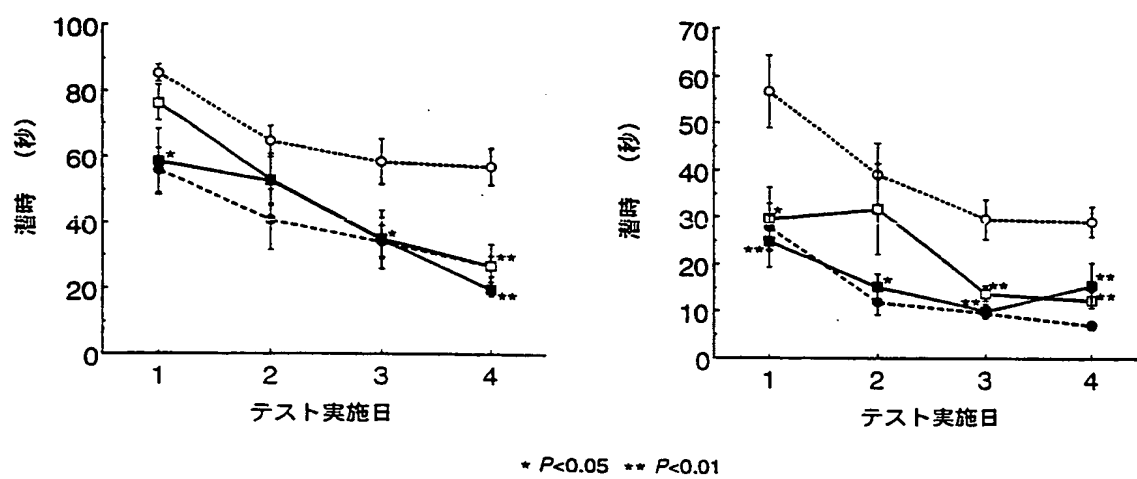
25. 神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイド Rb₁又はその代謝産物の使用。

26. 脳細胞保護剤または神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイド Rb₁又はその代謝産物の使用。

27. 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用医薬組成

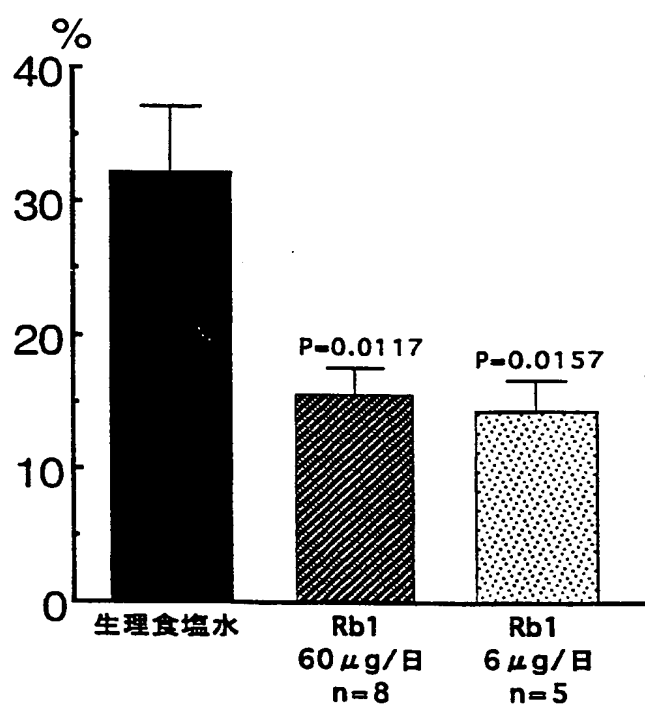
物を製造するためのジンセノサイド R b₁、もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用。

第 1 図



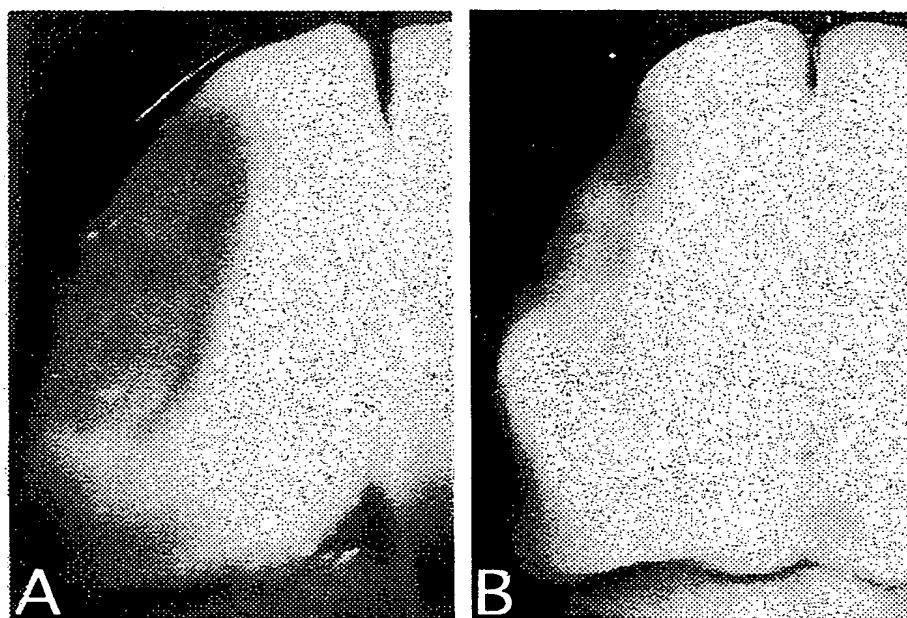


第 2 図



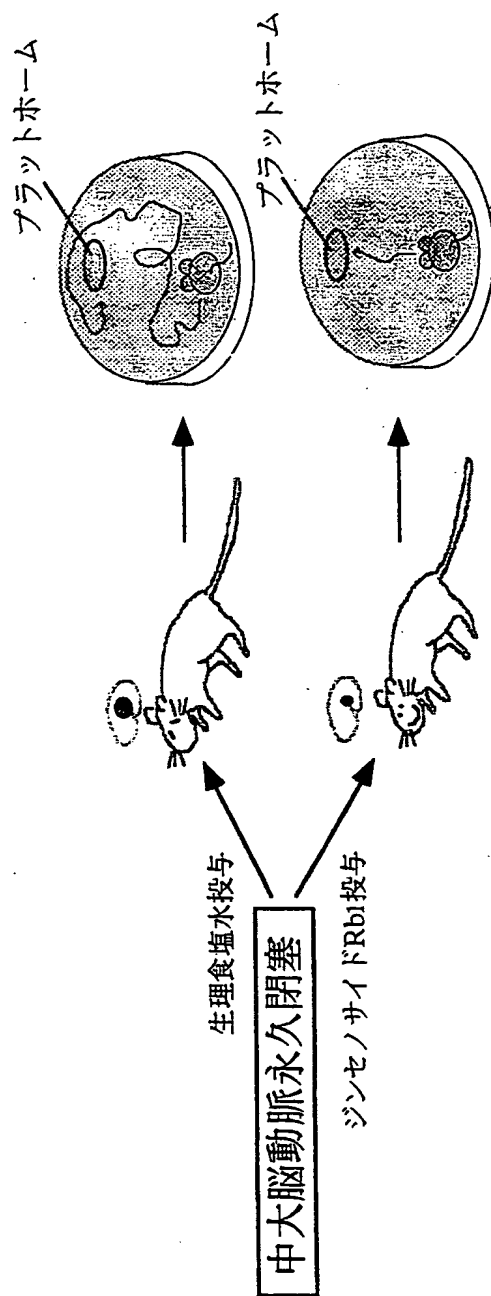


第 3 図



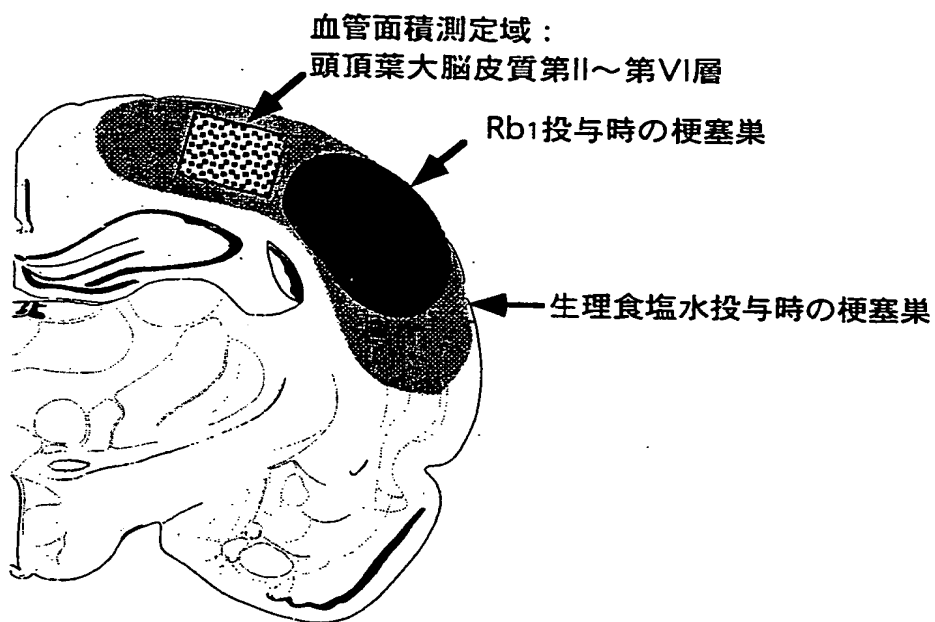


第 4 図



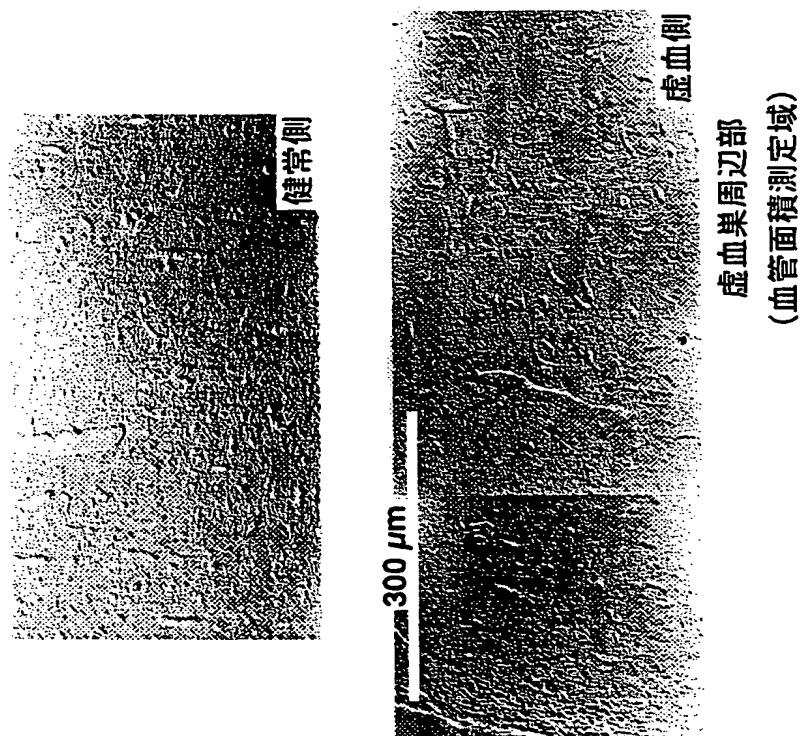


第 5 図



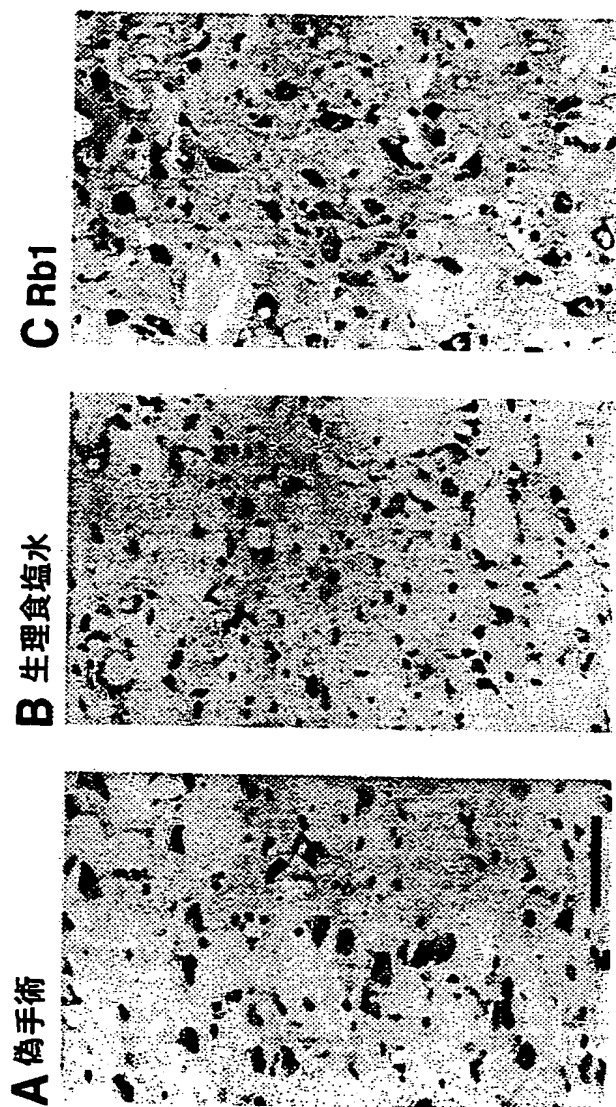


梗塞巣周辺の大脳皮質および健常側同部位大脳皮質血管網





第 7 図





第 8 図



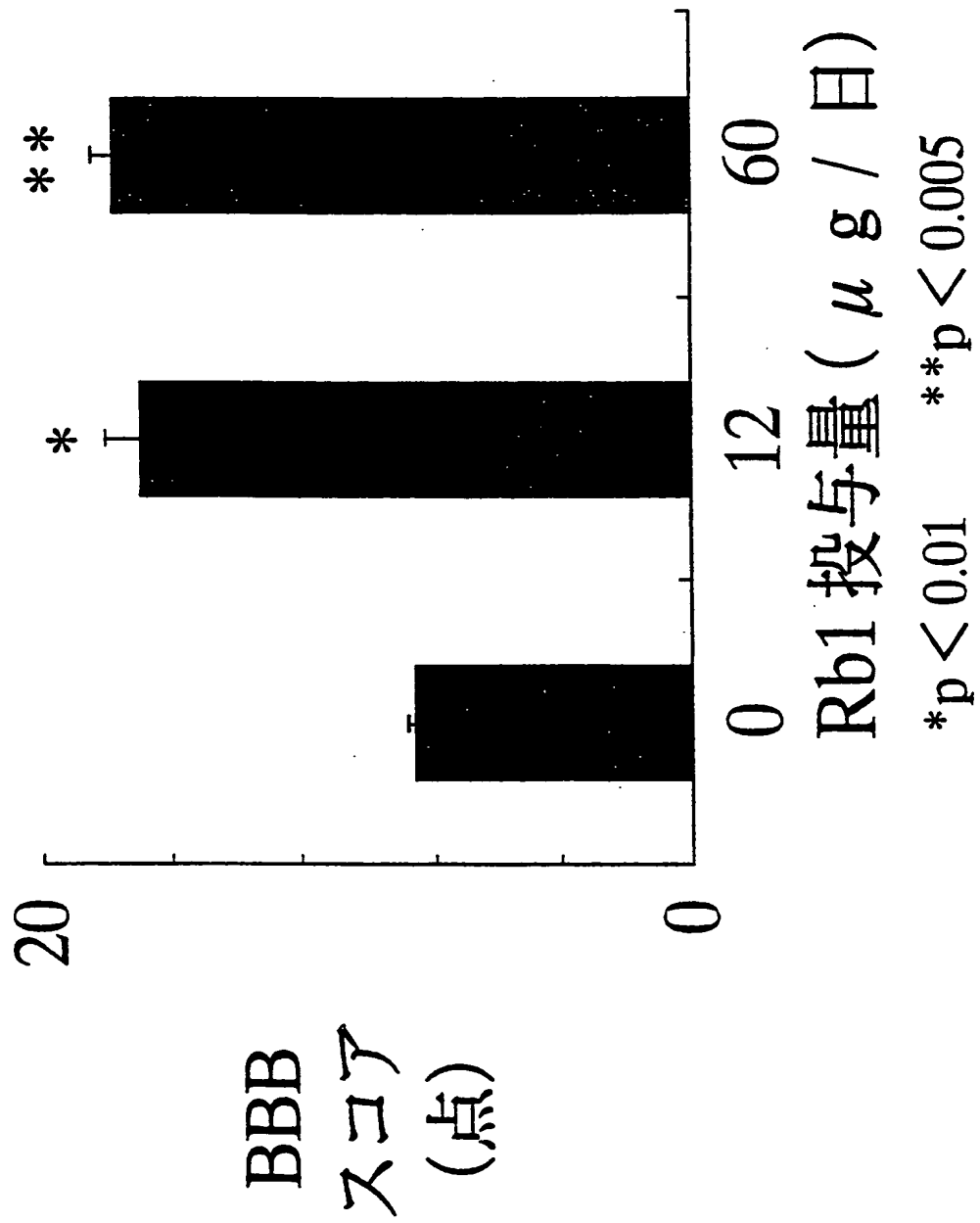
B.



A.



第 9 図





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06804

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
 G01N33/15, G01N33/50 // C07J17/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
 G01N33/15, G01N33/50, C07J17/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO, 90/08315, A (PANG, Peter, K., T. et al.), 26 July, 1990 (26.07.90) & US, 4966893, A & EP, 453515, A & JP, 4-504414, A & US, 5137878, A	21-25 1-12, 14-18, 27
X A	J.H.LIM, et al., "Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb ₁ , a main ingredient of ginseng root", Neuroscience Research, Vol.28 (1997) p.191-200	21-26 1-12, 14-18, 27
X A	M.LIU, et al., "Protective Effects of Ginsenoside Rb ₁ and Rg ₁ on cultured Hippocampal Neurons", Acta Pharmaceutica Sinica, Vol.30, No.9 (1995) p.674-678	21-26 1-12, 14-18, 27
X A	ZHANG YING-GE, et al., "Influences of ginsenosides Rb ₁ and Rg ₁ on reversible focal brain ischemia in rats", Acta Pharmacologica Sinica, Vol.17, No.1 (1996) p.44-48	21-26 1-12, 14-18, 27
X	JP, 10-36387, A (Kureha Chemical Industry Co., Ltd.), 10 February, 1998 (10.02.98) (Family: none)	19-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
23 February, 2000 (23.02.00)

Date of mailing of the international search report
07.03.00

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06804

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIU CHEN, "Cardiovascular Protection by Ginsenosides and Their nitric Oxide Releasing Action", Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol.23 (1996) p.728-732	13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06804

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

1) Inventions as set forth in claims 1 to 12 pertain to medicinal compositions for diseases caused by damage in nerve or spinal tissues which contain ginsenoside Rb₁, inventions as set forth in claims 15 and 16 pertain to medicinal compositions for worsened trauma in nerve or spinal tissues which contain ginsenoside Rb₁, and invention as set forth in claim 27 pertains to utilization of ginsenoside Rb₁ for producing the above medicinal compositions.

2) Invention as set forth in claim 13 pertains to medicinal compositions for promoting vascular regeneration or reconstruction which contain ginsenoside Rb₁.

3) Invention as set forth in claim 14 pertains to medicinal compositions for secondary degeneration of nerve or spinal tissues which contain ginsenoside Rb₁.
(See extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06804

第 II 欄の続き

4) Inventions as set forth in claims 17 and 18 pertain to medicinal compositions for inhibiting apoptosis or apoptosis-like cell death of oligodendrocytes which contain ginsenoside Rb₁.

5) Inventions as set forth in claims 19 and 20 pertain to medicinal compositions for demyelination which contain ginsenoside Rb₁.

6) Inventions as set forth in claims 21 to 23 pertain to methods for searching active ingredients for treating nerve or spinal tissue diseases by using ginsenoside Rb₁ as a lead compound, while invention as set forth in claim 25 pertains to methods for searching active ingredients in remedies for nerve or spinal tissue diseases by using ginsenoside Rb₁ as a lead compound.

7) Invention as set forth in claim 26 pertains to methods for searching brain cell protecting agents or nerve cell protecting agents by using ginsenoside Rb₁ as a lead compound.

Although inventions 1) to 7) as described above relate to techniques of applying ginsenoside Rb₁ or compounds obtained by using the same as a lead compound to medicines, the diseases to which these inventions are to be applied differ from each other. Moreover, it can be hardly said that these inventions are based on pharmacological effects closely relating to each other.

Such being the case, these groups of inventions as described in 1) to 7) are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept and, therefore, are not considered as complying with the requirement of unity of invention.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/06804

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
G01N33/15, G01N33/50 // C07J17/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
G01N33/15, G01N33/50, C07J17/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO, 90/08315, A (PANG, Peter, K., T. et al.) 26. 7月. 1990 (26. 07. 90) &US, 4966893, A &EP, 453515, A &JP, 4-504414, A &US, 5137878, A	21-25 1-12, 14-18, 27
X A	J. H. LIM, et al., "Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb ₁ , a main ingredient of ginseng root", Neuroscience Research, Vol. 28 (1997) p. 191-200	21-26 1-12, 14-18, 27
X A	M. LIU, et al., "Protective Effects of Ginsenoside Rb ₁ and Rg ₁ on cultured Hippocampal Neurons", Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 30, No. 9 (1995) p. 674-678	21-26 1-12, 14-18, 27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 02. 00

国際調査報告の発送日

07.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希



4 P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	ZHANG YING-GE, et al., "Influences of ginsenosides Rb ₁ and Rg ₁ on reversible focal brain ischemia in rats", Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 17, No. 1 (1996) p. 44-48	21-26 1-12, 14-18, 27
X	JP, 10-36387, A (呉羽化学工業株式会社) 10. 2月. 1998 (10. 02. 98) (ファミリーなし)	19-20
A	XIU CHEN, "Cardiovascular Protection by Ginsenosides and Their nitric Oxide Releasing Action", Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol. 23 (1996) p. 728-732	13

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

- 1) 請求の範囲 1-12 はジンセリト[®] Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲 15-16 はジンセリト[®] Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の外傷の悪化のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲 27 は上記医薬組成物を製造するためのジンセリト[®] Rb₁の使用に係る発明である。
- 2) 請求の範囲 13 はジンセリト[®] Rb₁を含有してなる血管の再生又は再構築を促進するための医薬組成物に係る発明である。
- 3) 請求の範囲 14 はジンセリト[®] Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の二次変性のための医薬組成物に係る発明である。
(続きあり)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第II欄の続き

- 4) 請求の範囲 17-18 はジニセリット[®] Rb₁ を含有してなるオリゴデント[®] サイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物に係る発明である。
- 5) 請求の範囲 19-20 はジニセリット[®] Rb₁ を含有してなる脱髄のための医薬組成物に係る発明である。
- 6) 請求の範囲 21-23 はジニセリット[®] Rb₁ をリード化合物として 神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療のための有効成分を探索する方法に係る発明であり、請求の範囲 24 は上記方法により得られた治療剤に係る発明であり、請求の範囲 25 は神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療剤の有効成分を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®] Rb₁ の使用に係る発明である。
- 7) 請求の範囲 26 は脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®] Rb₁ の使用に係る発明である。

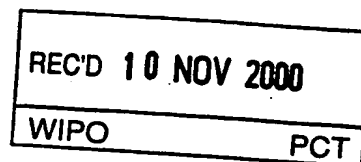
上記 1) ~ 7) は、ジニセリット[®] Rb₁ 又はこれをリード化合物として得られる化合物を医薬に適用する技術に関するものであるが、適用疾患はそれぞれ異なるものであり、また、これらが密接な薬理作用に基づくものであるとも言い難い。

したがって、1) ~ 7) に記載した発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められないので、この国際出願は単一性を満たしていると認めることはできない。

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]



出願人又は代理人 の書類記号 JA901392	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/06804	国際出願日 (日.月.年) 03.12.99	優先日 (日.月.年) 19.02.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105, G01N33/15, G0133/15, G01N33/50 // C07J17/00		
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input checked="" type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 14.04.00	国際予備審査報告を作成した日 27.10.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 中木 亜希 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4 P 9282



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2 ☒ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

1) 請求の範囲1-12はジニセリット[®]Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲15-16はジニセリット[®]Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の外傷の悪化のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲27は上記医薬組成物を製造するためのジニセリット[®]Rb₁の使用に係る発明である。

2) 請求の範囲13はジニセリット[®]Rb₁を含有してなる血管の再生又は再構築を促進するための医薬組成物に係る発明である。

3) 請求の範囲14はジニセリット[®]Rb₁を含有してなる神経組織又は脊髄組織の二次変性のための医薬組成物に係る発明である。

4) 請求の範囲17-18はジニセリット[®]Rb₁を含有してなるオリゴデント[®]サイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物に係る発明である。

5) 請求の範囲19-20はジニセリット[®]Rb₁を含有してなる脱髄のための医薬組成物に係る発明である。

6) 請求の範囲21-23はジニセリット[®]Rb₁をリード化合物として神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療のための有効成分を探索する方法に係る発明であり、請求の範囲24は上記方法により得られた治療剤に係る発明であり、請求の範囲25は神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療剤の有効成分を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®]Rb₁の使用に係る発明である。

7) 請求の範囲26は脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®]Rb₁の使用に係る発明である。

上記1)~7)は、ジニセリット[®]Rb₁又はこれをリード化合物として得られる化合物を医薬に適用する技術に関するものであるが、適用疾患はそれぞれ異なるものであり、また、これらが密接な薬理作用に基づくものであるとも言いがたい。したがって、1)~7)に記載した発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められないので、この国際出願は単一性を満たしていると認めることはできない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

☒ すべての部分

☐ 請求の範囲 _____ に関する部分



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-27	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-20, 22, 23, 27	有
	請求の範囲	21, 24-26	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-27	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

国際調査報告で引用された文献は下記

1. JP, 4-504414, A
2. Neuroscience Research, Vol. 28(1997)p. 191-200
3. Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 30, No. 9(1995)p. 674-678
4. Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 17, No. 1(1996)p. 44-48

である。

1) 請求の範囲21, 24, 25について

文献1には、ジンセノサイドRb₁がアルツハイマー型老人性痴呆症及び老人性痴呆症の治療に有効であることが記載されており、上記の両痴呆症は神経組織に対する疾患である。

本願出願前、薬物の技術開発分野において、ある特定の薬理活性を有する化合物をリード化合物として用い、該化合物の構造を改変し、種々のスクリーニングを行い、最適又は好適な化合物を選択することは周知技術あることから、ジンセノサイドRb₁をリード化合物として用い、アルツハイマー型老人性痴呆症及び老人性痴呆症の治療に有効な化合物を探索し、該化合物を医薬に適用することは、文献1の記載から当業者が容易に成し得たことである。

そして、請求の範囲21, 24及び25に記載された発明において奏せられる効果についても、文献1の記載及び上記周知技術から当業者が予測できないほどの格別顕著な効果が奏せられているとも認められない。

したがって、請求の範囲21, 24及び25に記載された発明は、文献1の記載から進歩性を有しない。

2) 請求の範囲26について

文献2及び3には、ジンセノサイドRb₁が神経細胞保護作用を有していることが記載されている。

文献4には、ジンセノサイドRb₁が脳保護作用を有していることが記載されている。

本願出願前、薬物の技術開発分野において、ある特定の薬理活性を有する化合物をリード化合物として用い、該化合物の構造を改変し、種々のスクリーニングを行い、最適又は好適な化合物を選択することは周知技術あることから、ジンセノサイドRb₁をリード化合物として用い、神経細胞保護作用又は脳保護作用を有する化合物を探索し、該化合物を医薬に適用することは、文献2～4の記載から当業者が容易に成し得たことである。

そして、請求の範囲26に記載された発明において奏せられる効果についても、文



補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

献 2～4 の記載及び上記周知技術から当業者が予測できないほどの格別顕著な効果が奏せられているとも認められない。

したがって、請求の範囲 26 に記載された発明は、文献 2～4 の記載から進歩性を有しない。

3) 請求の範囲 1-20, 22, 23 及び 27 について

請求の範囲 1-20, 22, 23 及び 27 に記載された発明は、国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、当業者にとって自明なものでもない。

(請求の範囲 21, 24 及び 25 に関して、本願出願人は、2000 年 9 月 18 日付け答弁書において、本発明において初めてジンセノサイド R b₁ 又はその代謝産物が、神経組織又は脊髄組織の疾患に対して極めて顕著な格段の作用効果があり、従来の他の有効成分とは明確な相違が見られることから、本発明の有効成分がリード化合物としての地位を与えられるに適したものであることを本発明が初めて開示したものである旨を主張している。しかしながら、ジンセノサイド R b₁ 又はその代謝産物をリード化合物としてどのような化合物を製造し、どのようなスクリーニングを行い、そして、具体的にどのような化合物を神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防又は治療剤として選択したかについては、本願明細書により十分に裏付けされておらず、ジンセノサイド R b₁ 又はその代謝産物自身の上記作用効果の記載が、ジンセノサイド R b₁ 又はその代謝産物のリード化合物として作用効果を裏付けるものとは認められない。

請求の範囲 26 に関して、本願出願人は、2000 年 9 月 18 日付け答弁書において、本発明において初めてジンセノサイド R b₁ 又はその代謝産物が、脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤として極めて顕著な格段の作用効果があり、従来の他の有効成分とは明確な相違が見られることから、本発明の有効成分がリード化合物としての地位を与えられるに適したものであることを本発明が初めて開示したものである旨を主張している。しかしながら、ジンセノサイド R b₁ 又はその代謝産物をリード化合物としてどのような化合物を製造し、どのようなスクリーニングを行い、そして、具体的にどのような化合物を脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤として使用するかについては、本願明細書により十分に裏付けされておらず、ジンセノサイド R b₁ 又はその代謝産物自身の上記作用効果の記載が、ジンセノサイド R b₁ 又はその代謝産物のリード化合物として作用効果を裏付けるものとは認められない。)



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

M.H

特 許 協 力 条 約

EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 JA901392	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP99/06804	国際出願日 (日.月.年) 03.12.99	優先日 (日.月.年) 19.02.99	
出願人 (氏名又は名称) 科学技術振興事業団			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している (第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

- 1) 請求の範囲 1-12 はジニセリット Rb₁ を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲 15-16 はジニセリット Rb₁ を含有してなる神経組織又は脊髄組織の外傷の悪化のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲 27 は上記医薬組成物を製造するためのジニセリット Rb₁ の使用に係る発明である。
- 2) 請求の範囲 13 はジニセリット Rb₁ を含有してなる血管の再生又は再構築を促進するための医薬組成物に係る発明である。
- 3) 請求の範囲 14 はジニセリット Rb₁ を含有してなる神経組織又は脊髄組織の二次変性のための医薬組成物に係る発明である。
(続きあり)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
G01N33/15, G01N33/50 // C07J17/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
G01N33/15, G01N33/50, C07J17/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO, 90/08315, A (PANG, Peter, K., T. et al.) 26. 7月. 1990 (26. 07. 90) &US, 4966893, A&EP, 453515, A&JP, 4-504414, A&US, 5137878, A	21-25 1-12, 14-18, 27
X A	J. H. LIM, et al., "Protection of ischemic hippocampal neurons b y ginsenoside Rb ₁ , a main ingredient of ginseng root", Neurosci ence Research, Vol. 28 (1997) p. 191-200	21-26 1-12, 14-18, 27
X A	M. LIU, et al., "Protective Effects of Ginsenoside Rb ₁ and Rg ₁ o n cultured Hippocampal Neurons", Acta Pharmaceutica Sinica, Vo l. 30, No. 9 (1995) p. 674-678	21-26 1-12, 14-18, 27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 02. 00

国際調査報告の発送日

07.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希



4 P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492



C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	ZHANG YING-GE, et al., "Influences of ginsenosides Rb ₁ and Rg ₁ on reversible focal brain ischemia in rats", Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 17, No. 1 (1996) p. 44-48	21-26 1-12, 14-18, 27
X	JP, 10-36387, A (呉羽化学工業株式会社) 10. 2月. 1998 (10. 02. 98) (ファミリーなし)	19-20
A	XIU CHEN, "Cardiovascular Protection by Ginsenosides and Their nitric Oxide Releasing Action", Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol. 23 (1996) p. 728-732	13



第II欄の続き

- 4) 請求の範囲 17-18 はジニセリット[®] Rb₁ を含有してなるオリゴデント[®] ナイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物に係る発明である。
- 5) 請求の範囲 19-20 はジニセリット[®] Rb₁ を含有してなる脱髄のための医薬組成物に係る発明である。
- 6) 請求の範囲 21-23 はジニセリット[®] Rb₁ をリード化合物として 神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療のための有効成分を探索する方法に係る発明であり、請求の範囲 24 は上記方法により得られた治療剤に係る発明であり、請求の範囲 25 は神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療剤の有効成分を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®] Rb₁ の使用に係る発明である。
- 7) 請求の範囲 26 は脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®] Rb₁ の使用に係る発明である。

上記 1) ~ 7) は、ジニセリット[®] Rb₁ 又はこれをリード化合物として得られる化合物を医薬に適用する技術に関するものであるが、適用疾患はそれぞれ異なるものであり、また、これらが密接な薬理作用に基づくものであるとも言えない。

したがって、1) ~ 7) に記載した発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められないので、この国際出願は単一性を満たしていると認めることはできない。



4 To
Translation

09/9/3689

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2900

NOV 09 2001

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference JA901392	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/06804	International filing date (day/month/year) 03 December 1999 (03.12.99)	Priority date (day/month/year) 19 February 1999 (19.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 31/704, 45/00, A61P 25/00, 43/00 105, G01N 33/15, 33/50 // C07J 17/00		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>9</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14 April 2000 (14.04.00)	Date of completion of this report 27 October 2000 (27.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06804

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06804

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68-1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 3.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 99/06804

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

1) Claims 1-12 describe an invention of pharmaceutical compositions containing ginsenoside Rb₁, for conditions due to injury to nervous tissue or spinal cord tissue; Claims 15-16 describe an invention of pharmaceutical compositions containing ginsenoside Rb₁, for conditions due to exacerbated trauma of nervous tissue or spinal cord tissue; and Claim 27 relates to the use of ginsenoside Rb₁ in producing aforementioned pharmaceutical compositions.

2) Claim 13 describes an invention of pharmaceutical compositions containing ginsenoside Rb₁, for promoting vascular regeneration or reconstruction.

3) Claim 14 describes an invention of pharmaceutical compositions containing ginsenoside Rb₁, for secondary changes in nervous tissue or spinal cord tissue.

4) Claims 17 and 18 describe an invention of pharmaceutical compositions containing ginsenoside Rb₁, for preventing oligodendrocyte apoptosis or apoptosis-like cell death.

5) Claims 19-20 describe an invention of pharmaceutical compositions containing ginsenoside Rb₁, for demyelination.

6) Claims 21-23 describe an invention of a method for screening active substances for treating diseases of nervous tissue or spinal cord tissue by using ginsenoside Rb₁ as a lead compound; Claim 24 describes an invention relating to therapeutic agents obtained by the aforementioned method, and Claim 25 describes an invention relating to the use of ginsenoside Rb₁ as a lead compound in a method for screening active substances for treating

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 99/06804

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

diseases of nervous tissue or spinal cord tissue.

7) Claim 26 describes an invention relating to the use of ginsenoside Rb_1 as a lead compound for screening brain cell protecting agents or nerve cell protecting agents.

1)-7) all relate to pharmaceutical applications of ginsenoside Rb_1 or compounds obtained by using it as a lead compound; however, the conditions to which these are applied are mutually different and unlikely to depend on closely related underlying pharmacological effects. Therefore, the groups of inventions described in 1)-7) do not constitute a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, and hence this international application does not fulfill the condition of unity of the invention.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 99/06804

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-27 (103)	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-20, 22, 23, 27	YES
	Claims	21, 24-26 (104)	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents are cited in the international search report.

1. JP, 4-504414, A
- ✓ 2. Neuroscience Research, Vol. 28 (1997), pp. 191-200
3. Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 30, No. 9 (1995), pp. 674-678
- ✓ 4. Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 17, No. 1 (1996), pp. 44-48

1) Claims 21, 24 and 25

Document 1 discloses the efficacy of ginsenoside Rb₁ for treating Alzheimer's disease and senile dementia, and these forms of dementia are diseases of nervous tissues.

The use of a certain specified compound with pharmacological activity as a lead compound, structural modification of said compound, screening and selection of optimum or preferred compounds was common practice in the pharmaceutical field prior to filing the present application. Therefore, given Document 1, a person skilled in the art could easily conceive of using ginsenoside Rb₁ as a lead compound for screening compounds efficacious for the treatment of Alzheimer's disease and senile dementia, and the pharmaceutical application of said compounds.

Moreover, the inventions described in Claims 21, 24

and 25 do not appear to offer any special advantageous effect above that expected by a person skilled in the art from the disclosure in Document 1 and the aforementioned common practice.

Therefore, the inventions described in Claims 21, 24 and 25 do not involve an inventive step in the light of Document 1.

2) Claim 26

Documents 2 and 3 disclose the nerve cell protecting action of ginsenoside Rb_1 .

Document 4 discloses the cerebral protecting action of ginsenoside Rb_1 .

The use of a certain specified compound with pharmacological activity as a lead compound, structural modification of said compound, screening and selection of optimum or preferred compounds was a common practice in the pharmaceutical field prior to filing the present application. Therefore, given Documents 2-4, a person skilled in the art could easily conceive of using ginsenoside Rb_1 as a lead compound for screening compounds which have a nerve cell protecting action or cerebral protecting action, and the pharmaceutical application of said compounds.

Moreover, the invention described in Claims 26 does not appear to offer any special advantageous effect above that expected by a person skilled in the art from the disclosure in Documents 2-4 and the aforementioned common practice.

Therefore, the invention described in Claim 26 does not involve an inventive step in the light of Documents 2-4.

3) Claims 1-20, 22, 23 and 27

The inventions disclosed in Claims 1-20, 22, 23 and

27 are not disclosed in the documents cited in the international search report or in other documents deemed relevant to the invention in question, and are not obvious to a person skilled in the art.

(In the written reply dated 18 September 2000, the applicant states in relation to Claims 21, 24 and 25 that the present invention shows for the first time that ginsenoside Rb₁ and metabolites thereof have an extremely marked advantageous effect on diseases of nervous tissue or spinal cord tissue and clearly differ from other prior active substances, and consequently discloses for the first time the application of an effective substance of the present invention as a lead compound. However, the description does not fully support the types of compounds made using ginsenoside Rb₁ or a metabolite thereof as a lead compound, how they are screened and what specific compounds might be selected for treating or preventing diseases of nervous tissue or spinal cord tissue; and the description of the aforementioned action and effects of ginsenoside Rb₁ and metabolites thereof does not support the action and effects of ginsenoside Rb₁ or a metabolite thereof as a lead compound.

In the written reply dated 18 September 2000, the applicant states in relation to Claim 26 that the present invention shows for the first time that ginsenoside Rb₁ and metabolites thereof have an extremely marked advantageous effect as nerve cell protecting agents and cerebral protecting agents and clearly differ from other prior active substances, and consequently discloses for the first time the application of an effective substance of the present invention as a lead compound. However, the description does not fully support the types of compounds made using ginsenoside Rb₁ or a metabolite thereof as a lead compound, how they are screened and what

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 99/06804

specific compounds might be used as nerve cell protecting agents and cerebral protecting agents; and the description of the aforementioned action and effects of ginsenoside Rb₁ and metabolites thereof does not support the action and effects of ginsenoside Rb₁ or a metabolite thereof as a lead compound.)

PCT

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
Taka-ai Building
9th floor
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103-0027
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)		
Applicant's or agent's file reference JA901392		
IMPORTANT NOTICE		
International application No. PCT/JP99/06804	International filing date (day/month/year) 03 December 1999 (03.12.99)	Priority date (day/month/year) 19 February 1999 (19.02.99)
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CN,EP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 24 August 2000 (24.08.00) under No. WO 00/48608

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

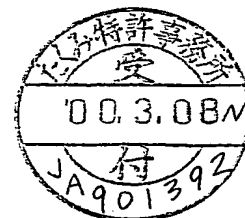
For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<p style="text-align: center;">The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p style="text-align: center;">Authorized officer J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
--	--



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)



出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋三丁目15番2号
高愛ビル 9階

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)
[PCT規則44.1]

発送日

(日.月.年)

07.03.00

出願人又は代理人
の書類記号

JA901392

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JP99/06804

国際出願日

(日.月.年)

03.12.99

出願人 (氏名又は名称)

科学技術振興事業団

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO

34, chemin des Colombettes

1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。

3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

- (1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

- (2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課
TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続きにおいて請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から15に減少された。]
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は削除された。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲1-11項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11に減少された。]
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。請求の範囲1-11項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲1-6及び14項は追加された。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加による。]
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合]：
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲1-10項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書” (PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる（明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない）。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない。英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない。見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

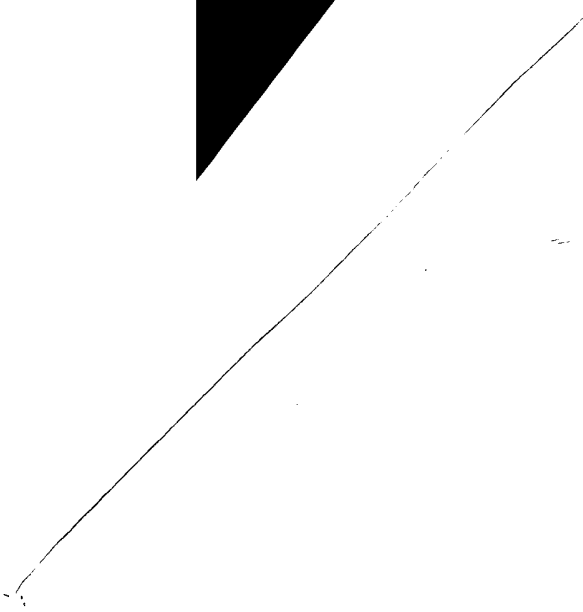
国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書（及び説明書）を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい（PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照）。詳細は国際予備審査請求書（PCT/ISA/401）の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]



出願人又は代理人 の書類記号 JA901392	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP99/06804	国際出願日 (日.月.年) 03.12.99	優先日 (日.月.年) 19.02.99	
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1・法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査を _____ するものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所 _____ ない国際出願の部分に係るものである。つまり、 _____
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則6:4(a) の第2文及び第3文の規定に _____ 従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

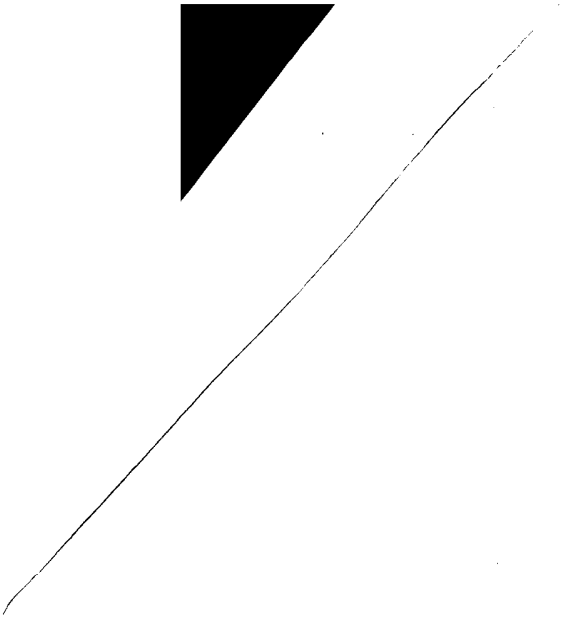
次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

- 1) 請求の範囲 1 - 12 はジニセリット Rb₁ を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲 15 - 16 はジニセリット Rb₁ を含有してなる神経組織又は脊髄組織の外傷の悪化のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲 27 は上記医薬組成物を製造するためのジニセリット Rb₁ の使用に係る発明である。
- 2) 請求の範囲 13 はジニセリット Rb₁ を含有してなる血管の再生又は再構築を促進するための医薬組成物に係る発明である。
- 3) 請求の範囲 14 はジニセリット Rb₁ を含有してなる神経組織又は脊髄組織の二次変性のための医薬組成物に係る発明である。
- (続きあり)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



第II欄の続き

- 4) 請求の範囲 17-18 はジニセリット[®] Rb₁ を含有してなるリゴデント[®] サイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物に係る発明である。
- 5) 請求の範囲 19-20 はジニセリット[®] Rb₁ を含有してなる脱髄のための医薬組成物に係る発明である。
- 6) 請求の範囲 21-23 はジニセリット[®] Rb₁ をリード化合物として 神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療のための有効成分を探索する方法に係る発明であり、請求の範囲 24 は上記方法により得られた治療剤に係る発明であり、請求の範囲 25 は神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療剤の有効成分を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®] Rb₁ の使用に係る発明である。
- 7) 請求の範囲 26 は脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジニセリット[®] Rb₁ の使用に係る発明である。

上記 1) ~ 7) は、ジニセリット[®] Rb₁ 又はこれをリード化合物として得られる化合物を医薬に適用する技術に関するものであるが、適用疾患はそれぞれ異なるものであり、また、これらが密接な薬理作用に基づくものであるとも言い難い。

したがって、1) ~ 7) に記載した発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められないので、この国際出願は単一性を満たしていると認めることはできない。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
G01N33/15, G01N33/50 // C07J17/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
G01N33/15, G01N33/50, C07J17/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO, 90/08315, A (PANG, Peter, K., T. et al.) 26. 7月. 1990 (26. 07. 90) &US, 4966893, A&EP, 453515, A&JP, 4-504414, A&US, 5137878, A	21-25 1-12, 14-18, 27
X A	J. H. LIM, et al., "Protection of ischemic hippocampal neurons b y ginsenoside Rb ₁ , a main ingredient of ginseng root", Neurosci ence Research, Vol. 28 (1997) p. 191-200	21-26 1-12, 14-18, 27
X A	M. LIU, et al., "Protective Effects of Ginsenoside Rb ₁ and Rg ₁ o n cultured Hippocampal Neurons", Acta Pharmaceutica Sinica, Vo l. 30, No. 9 (1995) p. 674-678	21-26 1-12, 14-18, 27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 02. 00

国際調査報告の発送日

07.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

4P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492



C (続き) . 関連すると認められる文献		国際出願番号 PCT/J P 99/06804
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	ZHANG YING-GE, et al., "Influences of ginsenosides Rb ₁ and Rg ₁ on reversible focal brain ischemia in rats", Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 17, No. 1 (1996) p. 44-48	21-26 1-12, 14-18, 27
X	JP, 10-36387, A (呉羽化学工業株式会社) 10. 2月. 1998 (10. 02. 98) (ファミリーなし)	19-20
A	XIU CHEN, "Cardiovascular Protection by Ginsenosides and Their nitric Oxide Releasing Action", Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol. 23 (1996) p. 728-732	13

